ÜBER DIE KATALYTISCHEN WIRKUNGEN DER LEBENDIGEN SUBSTANZ

ARBEITEN AUS DEM KAISER WILHELM-INSTITUT FÜR BIOLOGIE · BERLIN-DAHLEM

HERAUSGEGEBEN VON

OTTO WARBURG

MIT 83 ABBILDUNGEN

BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1928

Vorwort.

Der erste Abschnitt dieses Buchs enthält Versuche über Atmung und Gärung, der zweite Versuche über Kohlensäureassimilation und Nitratassimilation Beide Abschnitte sind durch Übersichten eingeleitet.

Der dritte Abschnitt soll zeigen, daß die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz auch für die Medizin wichtig sind. Versuche über die katalytischen Wirkungen wachsender Zellen sind hier zusammengefaßt

Der vierte Abschnitt ist eine Bibliographie Man findet hier die Titel der Arbeiten, die von mir und meinen Mitarbeitern über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz veröffentlicht worden sind

Das vorliegende Buch wird ergänzt durch den „Stoffwechsel der Tumoren“[1], ein methodisches Buch, in dem beschrieben wird, wie man die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz untersuchen und messen kann. —

Die Korrekturen hat Herr Dr H A Krebs gelesen, wofür ich ihm auch hier vielen Dank sage.

Berlin-Dahlem, im November 1927.

Otto Warburg.

---

[1] Warburg, O : Über den Stoffwechsel der Tumoren Berlin: Julius Springer 1926.

Inhaltsverzeichnis.

I. Atmung und Gärung.

II. Kohlensäureassimilation und Nitratassimilation.

III. Katalytische Wirkungen wachsender Zellen.

IV. Bibliographie.

I. Atmung und Gärung.

Nicht an anderer Stelle erschienen.

Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz.

Von

Otto Warburg.

Da die Erfahrung lehrt, daß man die Katalysatoren der lebendigen Substanz — die Fermente — von ihren inaktiven Begleitstoffen nicht trennen kann, so liegt es nahe, auf die Methoden der präparativen Chemie zu verzichten, und die Fermente unter ihren natürlichsten Wirkungsbedingungen, in der lebenden Zelle selbst, zu untersuchen. Sie sind hier zwar im Sinn der präparativen Chemie so unrein wie möglich Findet man aber Reagenzien, die nur mit den Fermenten und nicht mit den übrigen Zellbestandteilen reagieren, so stört die inaktive Zellsubstanz ebensowenig, wie bei chemischen Reaktionen die Gefäße stören, in denen man die Reaktionen ausführt Dann kann man die Fermente wie reine Stoffe untersuchen und aus ihren Reaktionen auf ihre Zusammensetzung schließen

Ich setze dabei voraus, daß Stoffe, die im Reagensglas reagieren, unter sonst gleichen Bedingungen auch in der lebenden Zelle reagieren, und daß Stoffe, die im Reagensglas nicht reagieren, auch in der lebenden Zelle nicht reagieren. Die Voraussetzung ist also Einheitlichkeit der unbelebten und belebten Natur in bezug auf die chemischen Vorgänge

1. Narkose.

Bringt man chemisch indifferente Substanzen wie Paraffine, Alkohole, Äther, in atmende oder gärende Zellen, so hören Atmung[1] und Gärung[2] auf, entfernt man sie wieder, so steigt der chemische Umsatz wieder auf seinen Normalwert Man nennt diese Erscheinung Narkose, die hemmenden chemisch indifferenten Stoffe Narkotica Atmungs- und Gärungsferment werden also durch die Narkotica verhindert, zu wirken, ohne daß sie dabei zerstört werden

---

[1] WARBURG, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol. Chem 69, 452 1910; 70, 413. 1911, Pflügers Arch. f. d ges Physiol. (mit WIESEL) 144, 465 1912, (mit USUI) 147, 100. 1912; Ergebn d. Physiol 14, 253 1914 — Ferner BATELLI u. STERN: Biochem. Zeitschr. 52, 226 1913. — VERNON: Journ. of physiol 45, 197. 1912; Biochem. Zeitschr. 47, 374 1913.

[2] DORNER, A.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 99. 1912.

Vergleicht man die Wirkung homologer Narkotica, so erhält man Reihen wie die folgende:

Narkoticum	Konzentration in Molen/Liter, die um 50% hemmt
Methyl-Urethan	1,3
Äthyl- ,,	0,33
Propyl- ,, .	0,13
Butyl- ,, . .	0,04
Amyl- ,, . .	0,02
Phenyl- ,, . . .	0,003

Die Wirkungsstärke der Narkotica steigt also in homologen Reihen sehr stark mit dem Molekulargewicht an, Anfangs- und Endglieder der Reihen unterscheiden sich in ihren Wirkungsstärken um das mehrhundertfache.

FARADAY[1] fand 1830, daß die Knallgaskatalyse durch kleine Mengen chemisch indifferenter Gase gehemmt wird. Wasserstoff und Sauerstoff vereinigen sich an festen Oberflächen zu Wasser. Setzt man Äthylen zu, so hört die Reaktion auf, entfernt man das Äthylen wieder, so geht die Reaktion weiter. FARADAY erklärte die Erscheinung durch die Annahme, daß Äthylen von den festen Oberflächen stärker angezogen wird, als Knallgas. Dann muß Äthylen das Knallgas von den Oberflächen verdrängen und damit die Knallgasreaktion zum Stillstand bringen.

FREUNDLICH[2] hat die Verdrängung von Oberflächen bei der Adsorption aus Lösungen zuerst gemessen. Ist Kohle mit einem Stoff A im Adsorptionsgleichgewicht und fügt man einen Stoff B, der von Kohle adsorbiert wird, hinzu, so erscheint A in der Lösung. Je stärker B adsorbiert wird, um so mehr verdrängt es A.

J. TRAUBE[3] fand, daß die Oberflächenspannung wäßriger Lösungen durch homologe organische Stoffe um so mehr erniedrigt wird, je höher das Molekulargewicht ist. Beim Aufstieg in einer homologen Reihe nimmt die „Oberflächenaktivität" zu, und zwar nimmt sie ungefähr in demselben Maß zu, wie die Wirkungsstärken der Narkotica nach Tabelle 1.

Dies sind die physikalisch-chemischen Grundlagen der Theorie der Narkose[4]. Nimmt man an, daß Atmung und Gärung Reaktionen an

[1] FARADAY: Experimental Researches VI. Reihe (Ostwalds Klassiker Nr. 87).
[2] FREUNDLICH, H.: Adsorption in Lösungen. Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385. 1906. — FREUNDLICH u. MASIUS: Festschrift für van Bemmelen 1910, S. 88.
[3] TRAUBE, J.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 153, 276. 1913.
[4] WARBURG, O. u. WIESEL: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465. 1912; 155, 547. 1914; Biochem. Zeitschr. 119, 134. 1921.

Oberflächen sind, so versteht man, daß sie durch chemisch indifferente Stoffe gehemmt werden und daß ein Narkoticum um so stärker ist, je stärker es von den festen Oberflächen der lebendigen Substanz angezogen wird.

Zur weiteren Begründung dieser Theorie führe ich die beiden folgenden Versuche an.

Bringt man[1] rote Vogelblutzellen in eine Kältemischung, so zerreißen beim Gefrieren die feinen die Strukturteile umhüllenden Membranen und man erhält beim Auftauen eine Flüssigkeit, in der die festen Zellbestandteile frei schweben. Zentrifugiert man, so erhält man zwei Schichten: eine klare, die frei ist von den festen Zellbestandteilen, und eine trübe, die die festen Zellbestandteile enthält. Mißt man in beiden Schichten die Atmung, so findet sich, daß nur die trübe Schicht atmet. Die gesamte Atmung ist also an die festen Zellbestandteile gebunden.

In dem zweiten Versuch[2] sind die natürlichen Oberflächen durch eine künstliche Oberfläche ersetzt. Löst man Aminosäuren in Wasser und fügt Blutkohle hinzu, so beladt sich die Oberfläche der Kohle mit Aminosäuren. Leitet man bei Körpertemperatur Sauerstoff ein, so verbrennen die Aminosäuren an der Oberfläche, wobei wie bei der Verbrennung in der lebendigen Substanz Ammoniak, Kohlensäure und Schwefelsäure als Endprodukte auftreten. Setzt man Narkotica hinzu, so hört die Verbrennung auf. Vergleicht man hierbei die Wirkungen homologer Narkotica, so erhält man dieselben Reihen, die für die Narkose der lebendigen Substanz gefunden worden sind. Hier ist also die Erscheinung der Narkose künstlich erzeugt. Hier kann man durch direkte Messungen zeigen, daß die Verdrängung von Oberflächen die Ursache der Narkose ist. Mißt man nämlich neben der Hemmung der Oxydation die Verdrängung, so findet man eine genaue Übereinstimmung. Wird der Bruchteil α einer Aminosäure von der Kohlenoberfläche verdrängt, so sinkt auch die Geschwindigkeit der Oxydation um den Bruchteil α.

Nicht nur die Narkose, sondern auch viele andere Reaktionshemmungen sind nach dem gleichen Prinzip zu erklären, so die von MOUREU beobachteten Oxydationshemmungen, die lange Zeit unverständlich waren. MOUREU[3] fand, daß die Autoxydation des Benzaldehyds und des Acroleins durch Spuren der verschiedenartigsten Stoffe gehemmt wird. ORLAND M. REIFF[4] zeigte, daß diese Oxydationen Oberflächenreaktionen sind, die an einer den Versuchsgefäßen adhärierenden Wasser-

[1] WARBURG, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 413. 1911.
[2] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. 119, 134. 1921.
[3] MOUREU u. DUFRAISSE: Cpt. rend. 174, 258; 175, 127. 1922.
[4] REIFF, ORLAND M.: Journ. of the amer. chem. soc. 48, 2893. 1926.

schicht vor sich gehen Indem die „Antioxygene“ MOUREUS sich an dieser Schicht ausbreiten, hemmen sie die Oxydation

2. Spezifische Wirkungen.

Wahrend es fast beliebig viele Stoffe gibt, die durch Adsorptionsverdrangung Lebensvorgange narkotisch hemmen, kennen wir nur ganz wenige Stoffe, die spezifisch-chemisch wirken Blausaure, Schwefelwasserstoff, Kohlenoxyd und Stickoxyd Diese Stoffe sind dadurch charakterisiert, daß sie, obwohl sie nur schwach adsorbiert werden, stark wirken Beispielsweise wird Blausaure[1] wie die schwachsten Narkotica adsorbiert, und wurde sie durch Adsorptionsverdrangung wirken, so wäre eine etwa normale Losung zur Atmungshemmung notig. Dagegen findet man, daß eine $^1/_{10000}$-normal-Blausaure die Atmung hemmt. Blausaure wirkt also rund 10000mal starker, als ihrer Adsorptionskonstanten entspricht

Wie die lebendige Substanz, so wird auch Blutkohle, an der Aminosauren verbrennen, spezifisch durch Blausaure inaktiviert, ein merkwürdiges und für die Aufklarung der Blausaurewirkung gunstiges Resultat

Gibt man zu Blutkohle, an der Aminosauren verbrennen, Blausaure, bis die Verbrennung gehemmt ist, und mißt die Adsorption, so zeigt sich, daß anders als beim Zusatz der Narkotica keine Aminosaure in der Losung erscheint Im Zustand der Blausaurehemmung ist die Kohlenoberflache mit Aminosauren bedeckt, Spuren von Blausaure, die an der Oberflache zu den Aminosauren hinzukommen, hemmen die Verbrennung Es folgt daraus, daß der Hauptteil der Kohlenoberflache katalytisch unwirksam ist Nur an Inseln, die ihrer Ausdehnung nach gegen die Gesamtoberflache verschwinden, geht die Verbrennung der Aminosauren vor sich

Um die chemische Zusammensetzung dieser Inseln zu ermitteln, habe ich mir die Aufgabe gestellt, Kohlen von den Eigenschaften der Blutkohle in ubersichtlichen Schritten aufzubauen[2] Es war also eine adsorbierende, aber katalytisch unwirksame Kohle herzustellen und in ihre Oberflache ein Stoff von den vorgeschriebenen katalytischen Eigenschaften einzulagern

Glüht man Zucker unter Zusatz von Kieselsaure, so erhalt man Kohle, die gut adsorbiert, aber katalytisch unwirksam ist Bei den Versuchen, diese Kohle katalytisch zu aktivieren, wurde von vornherein an Eisen als Aktivator gedacht, da Blutkohle das Eisen des Blutfarbstoffs enthalt Gluht man die Zuckerkohlen mit Eisen, so werden sie

[1] WARBURG, O. Biochem. Zeitschr 119, 161. 1921, 165, 196. 1925.
[2] WARBURG, O. u. W. BREFELD. Biochem Zeitschr 145, 461 1924

nicht aktiviert. Glüht man sie aber mit Eisen unter Zusatz von organisch gebundenem Stickstoff, so werden sie aktiv, und so kann man Kohlen herstellen, die weit aktiver sind, als die Blutkohlen. Von allen geprüften Stoffen war nur das Eisen imstande zu aktivieren, aber Eisen nur dann, wenn es durch Stickstoff an die Kohle gebunden wurde[1].

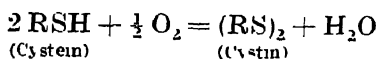
Das an Stickstoff gebundene Eisen der Kohle reagiert mit Blausäure unter Bildung einer reversiblen Verbindung und wird dabei katalytisch unwirksam. $^{1}/_{10000}$-n-Blausäure hemmt die Wirkung. Entfernt man die Blausäure aus den Lösungen, so tritt die Wirkung wieder auf.

Eisen an Stickstoff gebunden und in eine feste Oberfläche eingelagert besitzt Eigenschaften, die für das Atmungsferment charakteristisch sind. Es verbrennt Naturstoffe und reagiert mit Blausäure wie die lebendige Substanz.

3. Autoxydation.

Verzichten wir auf die Oberflächen und damit auf die Narkotisierbarkeit der Systeme, so werden die Bedingungen zur Untersuchung der Oxydationsvorgänge noch einfacher. Die Autoxydation von Naturstoffen in Lösung steht zwar der Atmung ferner, ist aber doch in mancher Hinsicht der Atmung verwandt.

Autoxydabel, das heißt durch molekularen Sauerstoff bei gewöhnlicher Temperatur angreifbar ist das von BAUMANN entdeckte Cystein, eine schwefelhaltige Aminosäure, die nach F. G. HOPKINS[2] ein Bestandteil der lebendigen Substanz ist. Löst man Cystein in Wasser und leitet Sauerstoff durch die Lösung, so wird die SH-Gruppe des Cysteins oxydiert und es entsteht Cystin nach der Gleichung

$$\underset{\text{(Cystein)}}{2\,RSH} + \tfrac{1}{2}\,O_2 = \underset{\text{(Cystin)}}{(RS)_2} + H_2O$$

MATHEWS und WALKER[3] fanden 1906, daß die Autoxydation des Cysteins durch Blausäure gehemmt wird. Seitdem spielt die Sulhydrylgruppe als autoxydabler Bestandteil der lebendigen Substanz in der Atmungstheorie eine Rolle.

Da 1 Molekül Blausäure ausreicht, um die Oxydation von vielen tausend Molekülen Cystein zu verhindern, so schien mir die Annahme, Cystein sei autoxydabel, einen Widerspruch zu enthalten. Denn wie man sich den Mechanismus der Blausäurewirkung auch denken mag, immer kann die Blausäure nur einen ihrer Menge äquivalenten Teil des Cysteins an der Oxydation verhindern.

---

[1] Vgl. hierzu auch E. K. RIDEAL u. W. M. WRIGHT: Journ. of the chem. soc. (London) **127**, 1347. 1925; 1813. 1926, 3182. 1926.

[2] HOPKINS, F. G.: Biochem. journ. **15**, 286. 1921.

[3] MATHEWS u. WALKER: Journ. of biol. chem. **6**, 21 u. 29. 1906.

In der Tat hat sich gezeigt[1], daß das Cystein nicht autoxydabel ist. Reinigt man Cysteinlosungen von Spuren Kupfer und Eisen, die die Laboratoriumslosungen immer enthalten, so hort die Oxydation des Cysteins auf Setzt man die herausgenommenen Metalle wieder zu, so erscheint die Oxydation wieder, setzt man Blausaure zu, so verschwindet die Wirkung der zugesetzten Metalle Die Autoxydation des Cysteins ist also nur eine scheinbare, in Wirklichkeit liegt eine Sauerstoffubertragung durch Schwermetall vor Dies wurde ubersehen, weil hunderttausendstel Milligramme an Eisen, Mangan oder Kupfer hier schon betrachtliche Wirkungen erzeugen, das sind Mengen, die die gewohnlichen Methoden der analytischen Chemie nicht mehr anzeigen Heute benutzt man Cysteinlosungen, um Schwermetallspuren nachzuweisen und zu bestimmen

Ein anderer einfacher Fall ist die Autoxydation der Kohlenhydrate, die in Phosphatlosungen[2] oder in ammoniakalischen Salzlosungen[3] auftritt Auch diese Oxydation ist nur scheinbar eine Autoxydation, in Wirklichkeit eine Sauerstoffubertragung durch Schwermetall. Blausaure hemmt die Oxydation, Spuren von Kupfer und Eisen beschleunigen sie, Blausaure bringt die Wirkung der zugesetzten Metalle wieder zum Verschwinden

Das allgemeine Ergebnis dieser und ahnlicher Versuche ist erstens, daß Naturstoffe unter naturlichen Bedingungen nicht autoxydabel sind, zweitens, daß Schwermetalle, wenn sie Sauerstoff auf Naturstoffe ubertragen, niemals als freie Ionen katalytisch wirken, sondern nur in besonderen komplexen Bedingungen Offenbar liegt hier ein Prinzip zugrunde, das die organische Natur vor dem Angriff des Sauerstoffs schützt Sauerstoff soll in der organischen Natur nur dort angreifen, wo die Energie der Verbrennung ausgenutzt werden kann, das heißt in der Atmung, nicht aber in Losungen, wo die Energie der Verbrennung dem Leben verloren ginge

Eine Ausnahme ist die Photooxydation fluorescierender Farbstoffe, wie Chlorophyll oder Hämatoporphyrin, die nach unsern Erfahrungen eine wahre Autoxydation ist[4]. Wie es scheint, entsteht in diesen Farbstoffen bei der Lichtabsorption ein Zustand, der mit dem Zustand katalytisch wirkender Schwermetallatome vergleichbar ist. — Im ubrigen ist unser Prinzip auf die Substanzen

---

[1] Warburg, O. u S. Sakuma Pflugers Arch f d ges Physiol. 200, 203. 1923 — Sakuma, S.· Biochem. Zeitschr 142, 68. 1923

[2] Warburg, O. u. Yabusoe Biochem Zeitschr 146, 380. 1924 — Meyerhof, O. u. Matsuoka Biochem Zeitschr 150, 1 1924. — Wind, F. Biochem Zeitschr 159, 58. 1925

[3] Krebs, H. A : Biochem. Zeitschr. 180, 377 1927.

[4] Tanaka, K.: Biochem. Zeitschr. 157, 425 1925. — Gaffron, H · Biochem Zeitschr 179, 157 1926.

und Bedingungen, fur die es ausgesprochen ist, zu beschranken, besagt also keineswegs, daß jede Autoxydation der organischen oder gar anorganischen Chemie eine Metallkatalyse sei Eine wahre Autoxydation ist beispielsweise die Oxydation von Leukomethylenblau[1] Andererseits gibt es auch in der anorganischen Chemie Falle von scheinbarer Autoxydation, z B die von TITOFF[2] untersuchte Oxydation der schwefligen Saure in wäßriger Losung — Oft, jedoch nicht immer ist es leicht, wahre und scheinbare Autoxydationen zu unterscheiden Beschleunigen Metalle und hemmen Komplexbildner, wie Blausaure und Pyrophosphat, so liegt eine scheinbare Autoxydation vor Der negative Ausfall dieser Reaktionen jedoch beweist nichts. Fugt man zu Haminkohle Eisensalze, so steigt die katalytische Wirksamkeit nicht Fugt man zu Lecithin-Eisen, zu Weinsaure-Eisen Blausaure, zu Cystein-Kupfer[3] Pyrophosphat, so wird die katalytische Wirkung der Metalle nicht gehemmt. Zugesetztes Metall beschleunigt nur dann, wenn katalytisch wirksame Komplexe entstehen, und Komplexbildner wie Blausäure und Pyrophosphat hemmen nur dann, wenn sie vermoge größerer Affinität den katalytisch wirkenden Komplexen das Metall entziehen.

4. Eisengehalt der lebendigen Substanz.

Die lebendige Substanz enthalt $^1/_{100}$ bis $^1/_{1000}$ % Eisen, eine Metallmenge, die mehr als ausreicht um den in der Atmung verschwindenden Sauerstoff zu ubertragen Dieses Eisen kann man der lebenden Substanz nicht entziehen Zuchtet man Zellen in eisenarmen Nahrlosungen, so hort das Wachstum auf, wenn das Eisen der Nahrlosungen verbraucht ist, setzt man Eisen zu, so geht die Vermehrung weiter So kann man Atmung durch Eisen erzeugen

Es ist aber im allgemeinen nicht moglich, Atmung durch Eisen zu erzeugen, wahrend man die Menge an lebendiger Substanz konstant halt Denn im allgemeinen sind die Substanzen nicht im Überschuß, die das Eisen durch komplexe Bindung zum Katalysator machen

Nur ein Objekt macht nach den bisherigen Erfahrungen eine Ausnahme[4] Fugt man zu der Substanz des Seeigeleis Eisensalz so steigt die Geschwindigkeit der Oxydation, und zwar steigt sie in dem Maß als man den naturlichen Eisengehalt vermehrt Hier ist also der Sauerstoffverbrauch sogar dem Eisengehalt proportional

5. Hämoglobin.

Eine komplexe Eisenverbindung, die in der Natur vorkommt, ist der rote Blutfarbstoff, das Hamoglobin

Hamoglobin besteht aus einer ungefarbten Eiweißkomponente, die uns hier nicht interessiert, und der Farbstoffkomponente, einer komplexen Eisenpyrrolverbindung, in der das Eisen an Stickstoff gebunden ist.

---

[1] WARBURG, O. Biochem. Zeitschr. 142, 518 1923.
[2] TITOFF· Zeitschr. f physikal. Chem 45, 641. 1903.
[3] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. 187, 255. 1927.
[4] WARBURG, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 92, 231. 1914.

NENCKI, KÜSTER, WILLSTAETTER und HANS FISCHER verdanken wir im wesentlichen unsere Kenntnisse von der Konstitution dieser wichtigen Substanz.

Das Eisen des Hämoglobins vereinigt sich in den Lungencapillaren mit dem Sauerstoff zu einer dissoziierenden Verbindung und gibt ihn in den Gewebecapillaren, wo der Sauerstoffdruck niedriger ist, wieder ab. Von hier aus diffundiert der Sauerstoff in die Körperzellen, in denen er veratmet wird. Das Eisen des Hämoglobins überträgt also den Sauerstoff von den Lungen zu anderen Stellen des Körpers, aber überträgt nicht den Sauerstoff auf organische Moleküle. Hämoglobin, das mit den atmenden Zellen nicht in Berührung kommt, ist nicht Katalysator, sondern Transportmittel.

LIEBIG[1], der diese Tatsachen nicht kannte, stellte 1843 die Theorie auf, der Blutfarbstoff sei das Atmungsferment. LIEBIG gab seine Theorie bald wieder auf, doch hat sich die Verwechslung zwischen Hämoglobin und Atmungsferment in der chemischen Literatur lange Zeit gehalten. Fast scheint es, als ob die Chemiker hier einen Zusammenhang ahnten, der nach den neusten Ergebnissen der Biologie tatsächlich besteht. Atmungsferment und Hämoglobin sind zwar nicht identisch, aber, wie aus ihren Verhalten gegen Kohlenoxyd folgt, nahe verwandt.

6. Reaktion des Kohlenoxyds mit Hämoglobin.

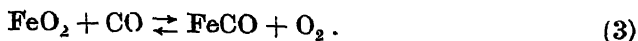
Wenn Hämoglobin Sauerstoff aufnimmt, so reagiert ein Atom Eisen mit einem Molekül Sauerstoff nach der Gleichung

$$Fe + O_2 \rightleftarrows FeO_2\,. \qquad (1)$$

In dieser Reaktion kann Kohlenoxyd den Sauerstoff vertreten

$$Fe + CO \rightleftarrows FeCO \qquad (2)$$

Lassen wir Sauerstoff und Kohlenoxyd gleichzeitig auf Hämoglobin einwirken, so konkurrieren beide Gase um das Eisen des Hämoglobins. Die Bilanzgleichung dieser Reaktion, auf der die Kohlenoxydvergiftung beruht, ist[2]

$$FeO_2 + CO \rightleftarrows FeCO + O_2\,. \qquad (3)$$

Hierbei verteilt sich das Eisen zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd nach Maßgabe der Gas-Partialdrucke, im Gleichgewicht ist

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = K \qquad (4)$$

---

[1] LIEBIG: Tierchemie, zweite Aufl., S. 241. Braunschweig 1843. In der dritten Auflage ist die „Theorie der Respiration" fortgelassen.

[2] DOUGLAS, HALDANE u. HALDANE, Journ. physiol. 44, 275. 1912. — ANSON, BARCROFT, MIRSKY u. OINUMA, Proc. Roy. Soc. 97, 61. 1925.

eine Gleichung, die eine Reihe sehr spezieller Eigenschaften des Hamoglobins zusammenfaßt Fur keine andere bekannte Substanz findet man etwas Ähnliches

Belichtet man Kohlenoxydhamoglobin, so wird es, wie JOHN HALDANE[1] 1896 fand, in Kohlenoxyd und freies Hamoglobin gespalten Sauerstoffhamoglobin dagegen reagiert nicht auf Belichtung Die Folge ist, daß sich bei Belichtung die Verteilung des Eisens zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd andert Bringen wir Hamoglobin im Dunkeln mit Sauerstoff und Kohlenoxyd ins Gleichgewicht und belichten, so stellt sich ein neues Gleichgewicht ein, dessen Konstante großer ist als im Dunkeln

$$K_{hell} > K_{dunkel}, \tag{5}$$

eine zweite Beziehung, die eine ganz spezielle Eigenschaft des Hamoglobins ausdrückt. Es gibt in der Chemie keinen andern Fall von reversibler photochemischer Kohlenoxydabspaltung

7. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung.

Seit man die Reaktion des Kohlenoxyds mit Hamoglobin kennt, die CLAUDE BERNARD in der Mitte des vorigen Jahrhunderts entdeckte, hat man sich gefragt, ob Kohlenoxyd nur auf das Hamoglobin wirke, und nicht außerdem noch auf die Zellen des Korpers Die Antwort war immer negativ Kohlenoxyd galt als Typus der reinen Blutgifte, als das es schon von CLAUDE BERNARD bezeichnet worden war

Dies stimmt zwar toxikologisch, ist aber doch unrichtig Kohlenoxyd von einigen $^{1}/_{1000}$ Atmospharen Druck der Atmungsluft beigemischt, treibt den Sauerstoff aus dem Hamoglobin aus und wirkt deshalb giftig Es ist wahr, daß bei diesen niedrigen Kohlenoxyddrucken keine Wirkung auf Korperzellen nachweisbar ist Laßt man aber den Kohlenoxyddruck bis zur Großenordnung einer Atmosphare wachsen, so treten Wirkungen[2] auf und zwar wird die Atmung der Zellen durch Kohlenoxyd gehemmt Das Atmungsferment bildet eine dissoziierende Kohlenoxydverbindung

Die Hemmung der Atmung durch Kohlenoxyd ist nicht nur von dem Kohlenoxyddruck abhangig, sondern auch von dem gleichzeitig herrschenden Sauerstoffdruck Laßt man den Kohlenoxyddruck konstant und erhoht den Sauerstoffdruck, so kann man die Atmungshemmung zum Verschwinden bringen Das Kohlenoxyd wird also aus seiner Verbindung mit dem Atmungsferment durch Sauerstoff ausgetrieben

---

[1] HALDANE, JOHN u. SMITH Journ of physiol 20, 497 1896. — Vgl. auch HARTRIDGE u. ROUGHTON. Proc of the roy. soc of London, Ser B. 94, 336 1923.

[2] WARBURG, O Biochem. Zeitschr 177, 471. 1926.

Mißt man die Wirkung des Kohlenoxyds bei verschiedenen Kohlenoxyd- und Sauerstoffdrucken, so laßt sich aus den Atmungshemmungen die Verteilung des Atmungsferments zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff berechnen. Man findet dann[1], daß die für die Verteilung des Hamoglobins gefundene Gleichung (4) auch fur die Verteilung des Atmungsferments gilt. Nur der Zahlenwert der Konstante K ist ein anderer, für die Verteilung des Atmungsferments in Hefe 10, für die Verteilung des Hämoglobins von der Großenordnung 10^{-2}

Bringt man Zellen im Dunkeln mit einem Kohlenoxyd-Sauerstoffgemisch ins Gleichgewicht, das die Atmung hemmt, und belichtet, so erscheint die normale Atmung und verschwindet wieder beim Verdunkeln. Die Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments dissoziiert also, wie Kohlenoxyd-Hamoglobin, im Licht Auch fur das Atmungsferment gilt die Beziehung

$$K_{\text{hell}} > K_{\text{dunkel}}$$

Belichtet man durch Kohlenoxyd gehemmte Zellen monochromatisch, mit Licht gleicher Intensitat, aber verschiedener Wellenlange, so findet man, daß blau sehr stark wirkt, grun und gelb schwacher, rot gar nicht. Da Licht photochemisch nur wirkt, wenn es absorbiert wird, so folgt, daß das Atmungsferment in seiner Verbindung mit Kohlenoxyd eine gefarbte Substanz ist, und zwar, wie das Kohlenoxyd-Hamoglobin, von roter Farbe Obwohl die Menge an Ferment in den Zellen zu klein ist, als daß man seine Farbe erkennen oder die Licht-Absorption messen konnte, ist es so doch moglich, die Farbe des Atmungsferments zu bestimmen.

Durch die Kohlenoxydversuche ist die Schwermetalltheorie der Atmung bewiesen, da nur Schwermetalle mit Kohlenoxyd bei gewohnlicher Temperatur reagieren Es ist ferner, durch die Gultigkeit der Verteilungsgleichung, bewiesen, daß das Schwermetall des Atmungsferments den Sauerstoff als ganzes Molekul aufnimmt, und zwar ein Atom Metall ein Molekul Sauerstoff Endlich ist aus der Haufung gleicher und spezieller Eigenschaften, die hier vorliegt, zu schließen, daß das Atmungsferment eine Eisenpyrrolverbindung ist, in der das Eisen wie im Hamoglobin an Pyrrolstickstoff gebunden ist Offenbar war es kein Zufall, daß das an Stickstoff gebundene Eisen der Kohle Eigenschaften zeigte, die fur das Atmungsferment charakteristisch sind

8. Cytochrom.

KEILIN[2] fand, daß eine mit dem Blutfarbstoff verwandte Eisenpyrrolverbindung weitverbreitet in der Natur vorkommt, in tierischen

[1] WARBURG, O Biochem. Zeitschr 189, 354. 1927

[2] KEILIN, D Proc. of the roy soc of London, Ser B. 98, 312 1925; 100, 129 1926.

Zellen, Pflanzenzellen, Hefen und Bakterien. KEILIN nennt diese Verbindung, die wie der Blutfarbstoff rot ist, Cytochrom. Sie ist identisch mit MAC MUNNS Histohämatin[1], an dessen Existenz die Wissenschaft vor den Arbeiten KEILINS nicht glaubte.

Cytochrom geht bei dem Versuch, es aus den Zellen zu extrahieren, zugrunde, so daß man seine Eigenschaften nur spektroskopisch untersuchen kann. Oxydiertes und reduziertes Cytochrom unterscheiden sich durch ihr Absorptionsspektrum. In Zellen, denen man den Sauerstoff entzieht, sieht man das charakteristische vierbandige Spektrum des reduzierten Cytochroms; sättigt man mit Sauerstoff, so oxydiert sich das Cytochrom und die Banden verschwinden.

Cytochrom reagiert nicht mit Kohlenoxyd[2] und unterscheidet sich dadurch von dem Hämoglobin und von dem Atmungsferment. Andererseits verhindert Kohlenoxyd die Reoxydation des Cytochroms. Es folgt daraus, daß Cytochrom nicht autoxydabel ist. Es ist der aktivierte Sauerstoff des Atmungsferments, nicht der molekulare Sauerstoff, der das Cytochrom in der Zelle oxydiert.

Als komplexe Eisenpyrrolverbindung, die in der lebenden Zelle die Erscheinungen der Oxydation und Reduktion zeigt, ist Cytochrom eine physiologisch außerordentlich interessante Substanz. Es ist möglich, daß sie in der Atmung als Peroxydase wirkt, indem sie aktivierten Sauerstoff auf organische Moleküle überträgt.

9. Gärung.

Ist die Schwermetalltheorie der Atmung bewiesen, so ist es im Prinzip auch die Schwermetalltheorie der Gärung. Denn wie das Atmungsferment bildet das Gärungsferment dissoziierende Blausäure[3] und Schwefelwasserstoffverbindungen[4]. Ein von den Atmungsversuchen unabhängiger Versuch bestätigt diesen Schluß.

Stickoxyd vereinigt sich mit einfachen und komplexen Schwermetallsalzen zu reversiblen Verbindungen. Bekannt ist die braune Stickoxydverbindung des Ferrosulfats, die in der chemischen Analyse eine Rolle spielt, von komplexeren Verbindungen das von HÜFNER entdeckte Stickoxyd-Methämoglobin. Reversible Reaktionen mit Stickoxyd sind nicht minder spezifisch für Schwermetall, wie reversible Reaktionen mit Kohlenoxyd.

---

[1] MAC MUNN: Journ. of physiol. 8, 51. 1887; Philosoph. transactions roy. soc. 177, 267. 1886.

[2] WARBURG, O.: Die Naturwissenschaften 15, H. 26. 1927.

[3] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. 165, 196. 1925.

[4] NEGELEIN, E.: Biochem. Zeitschr. 165, 203. 1925.

Bringt man gärende Zellen in Stickoxyd[1], so wird die Gärung gehemmt, um so stärker, je tiefer die Temperatur ist. Treibt man das Stickoxyd mit Wasserstoff oder Stickstoff aus, so erscheint wieder die normale Gärung. Stickoxyd bildet also mit dem Gärungsferment eine reversible Verbindung. Die Festigkeit dieser Verbindung nimmt mit sinkender Temperatur stark zu, ganz so wie die Festigkeit der einfachen Schwermetall-Stickoxydverbindungen, z. B. des Stickoxyd-Ferrosulfats.

Fassen wir mit Pasteur die Gärungen als innermolekulare Sauerstoffübertragungen auf, so sind hiermit die energieliefernden chemischen Reaktionen der lebendigen Substanz zurückgeführt auf *eine* Elementarreaktion: die Sauerstoffübertragung durch Schwermetall, die in der Atmung eine Übertragung von freiem Sauerstoff, in der Gärung eine Übertragung von gebundenem Sauerstoff ist.

10. Verallgemeinerung.

Schwermetallkatalysen sind auch die BLACKMANNsche Reaktion, die ein Teilvorgang der Kohlensäureassimilation ist, die Nitratassimilation und die Wasserstoffperoxydspaltung. Denn auch die Fermente dieser Reaktionen bilden dissoziierende Blausäure-[2] und Schwefelwasserstoffverbindungen[3].

Füge ich noch hinzu, daß diese Reaktionen auch Oberflächenreaktionen[2] sind, so erkennt man, daß den wesentlichsten katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz das gleiche Prinzip zugrunde liegt. Die Metalle und die Art ihrer Bindung mögen variieren, das Prinzip bleibt dasselbe.

11. Platinkatalysen.

Überblickt man die Geschichte des Fermentproblems, so sieht man, wie früh eine Ahnung dieses Prinzips in der Wissenschaft auftaucht. Seit EDMUND DAVY[4] ist das feinverteilte Platin das Fermentmodell der Chemiker. DAVY entdeckte 1820 das Platinmohr und seine katalytischen Wirkungen. BERZELIUS[5] schrieb 1832: „Die Gärungen beruhen möglicherweise auf Kräften ähnlich denen, die Platinmohr auf Wasserstoff ausübt, oder denen, die Edelmetalle und deren Oxyde auf Wasserstoffperoxyd ausüben.“ Für SCHÖNBEIN war die Wasserstoffperoxyd-

---

[1] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. 189, 354. 1927.

[2] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. 103, 188. 1920; 100, 230. 1919. — WARBURG, O. u. E. NEGELEIN: Biochem. Zeitschr. 110, 66. 1920. — WARBURG, O. u. T. UYESUGI: Biochem. Zeitschr. 146, 486. 1924.

[3] NEGELEIN, E.: Biochem. Zeitschr. 165, 203. 1925.

[4] DAVY, EDMUND: Philosoph. transact. roy. soc. 1820 (Part I) S. 108.

[5] BERZELIUS: Traité de Chimie 6, 400. Paris 1832.

spaltung durch Platin[1], das „Urbild aller Gärungen". BREDIG[2] nannte die kolloiden Edelmetallösungen „anorganische Fermente".

Die katalytischen Wirkungen des Platins und der lebendigen Substanz sind verwandt, weil beide Wirkungen Schwermetallwirkungen an Oberflächen sind. Dieser Zusammenhang wurde im vorigen Jahrhundert nicht erkannt, weil die Eigenschaften der lebendigen Substanz zu wenig untersucht waren. BERZELIUS wußte nicht, daß Eisen ein integrierender Bestandteil der lebendigen Substanz ist. LIEBIG[3] schrieb 1843: „Die Blutkörperchen enthalten eine Eisenverbindung, kein anderer Bestandteil der lebendigen Körperteile enthält Eisen." Zur Zeit der BREDIGschen Arbeiten war noch nicht nachgewiesen, daß die chemischen Vorgänge in der lebendigen Substanz Oberflächenreaktionen sind. BREDIG wußte zwar, daß Blausäure sowohl die Atmung als auch die Platinkatalysen hemmt. Aber nicht nur Blausäure, sondern alle möglichen Substanzen hemmten, und erst die Unterscheidung zwischen unspezifischen Oberflächenwirkungen und spezifisch-chemischen Wirkungen konnte auf die richtige Spur führen.

12. Katalyse in der chemischen Technik.

Die Arbeiten, über die hier berichtet wurde, entstanden in einer Zeit, in der die chemische Großindustrie, in den Verfahren von HABER, BOSCH und MITTASCH, die Methoden der Katalyse entwickelte. Sie ging dabei allmählich von den Platinmetallen zu den Metallen der Eisengruppe über, und wie es scheint, sind heute die Hauptverfahren Eisenkatalysen an Oberflächen. „Will man", sagt MITTASCH[4], „die Elemente in bezug auf ihren katalytischen Wert vergleichen, so wird man, wenn man die anorganische Großindustrie im Auge hat, den Metallen der Eisengruppe, insbesondere dem Eisen selbst, den Preis zuerkennen." So hat die Chemie den Weg gefunden, den die lebendige Natur seit jeher gegangen ist.

---

[1] SCHOENBEIN: Journ. f. prakt. Chem. (1) 89, 22. 1863; (1) 89, 323. 1863; (1) 105, 198. 1868.

[2] BREDIG u. MÜLLER v. BERNECK: Zeitschr. f. physikal. Chem. 31, 258. 1899. — BREDIG u. IKEDA: Zeitschr. f. physikal. Chem. 37, 1. 1901. — ERNST, CARL: Zeitschr. f. physikal. Chem. 37, 448. 1901.

[3] LIEBIG: Tierchemie, zweite Auflage, S. 241. Braunschweig 1843.

[4] MITTASCH, A.: Ber. d. dtsch. chem. Ges. 59, 13. 1926.

Pflugers Arch. f. d ges. Physiol 144, 465 1912.

Über die Wirkung von Substanzen homologer Reihen auf Lebensvorgänge.

Von

Otto Warburg und Rudolf Wiesel.

(Aus der Medizinischen Klinik in Heidelberg)

Versuche über die Beeinflussung der Oxydationsgeschwindigkeit in lebenden Zellen durch Ketone, Nitrile, Urethane, Amide, Saureester und ahnliche Substanzen haben bisher folgendes ergeben[1]:

1. Die Wirkung ist abhangig von der Konzentration 0,5% und 1% Amylalkohol wirken ganz verschieden; 0,5% Amylalkohol, in beliebigen Mengen, wirkt stets gleich, vorausgesetzt, daß die Zellen bis zum Gleichgewicht darin gewaschen sind.

2. Die Wirkung ist reversibel. Entfernt man eine hemmende Substanz aus der umspulenden Flussigkeit, so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit auf ihren ursprunglichen Wert

3 Die Veranderungen, die Ursache der Oxydationsbeeinflussung sind, treten sofort ein; Urethan wirkt in 100 Minuten nicht anders als in 15 Minuten.

4. Die Wirkung ist unabhangig von den im chemischen Sinn reaktionsfahigen Gruppen Zwei Nitrile konnen enorm verschieden wirken, ein Nitril und ein Keton bei ahnlichen physikalischen Eigenschaften ganz ahnlich. Die Eigenschaften, auf die es ankommt, sind ausgepragter bei den höheren Gliedern einer homologen Reihe, sie sind ausgepragter, gleiche Kohlenstoffzahl vorausgesetzt, bei Korpern mit unverzweigter als bei solchen mit verzweigter Kette

Es sind das, in allen vier Punkten, dieselben Beziehungen, die von Hans Meyer[2] und Overton[3] fur die Gehirnnarkose der Kaulquappen gefunden wurden; und wenn auch bei unseren Versuchen die absoluten Konzentrationen von den Meyer-Overtonschen Zahlen erheblich ab-

[1] Warburg, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol Chem 69, 452; 70, 413; 71, 479; 76. — Verhandl d dtsch Kongr f inn Med. 28, 553. — Onaka: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem 70, 433

[2] Meyer, Hans Schmiedebergs Arch. 42, 109, und Baum· 42, 119; 46, 338.

[3] Overton· Studien uber die Narkose Jena 1901.

wichen, so trugen wir bisher kein Bedenken, die Schlußfolgerungen dieser Forscher, die bekannte Lipoidtheorie, auch zur Erklarung der Oxydationshemmungen heranzuziehen.

Nun laßt sich nicht leugnen, daß die Lipoidtheorie, die fur Einwirkungen auf Ganglienzellen und Nerven, gemaß der lipoiden Zusammensetzung dieser Gebilde, vieles fur sich hat, fur die Erklarung chemischer Reaktionsbeeinflussungen nicht sehr anschaulich ist, und in der Tat konnen wir Beobachtungen mitteilen, die vielleicht nach einer anderen Richtung weisen. Wir ziehen es deshalb vor, unsere Schlüsse nur dahin zu formulieren, daß die Substanzen der untersuchten homologen Reihen in lebenden Zellen reversible physikalische[1] Zustandsanderungen erzeugen, deren Natur aber zunachst nicht naher zu prazisieren.

I.

Die Beeinflussung der Oxydationsprozesse durch Substanzen homologer Reihen ist bisher an Echinideneiern und roten Vogelblutzellen studiert worden[2] Es ist nicht ohne Interesse, wie weit die hier gewonnenen Resultate verallgemeinert werden dürfen, und wir haben deshalb die Versuche auf moglichst verschiedene Zellarten ausgedehnt, namlich Bakterien (Vibrio Metschnikoff. Bacill typhi abdom , Staphylokokken), Hefen, Spermatozoen von Fischen, Thymuslymphocyten von Kalbern und schließlich Leberzellen[3] von Froschen und Mausen Überall stießen wir auf ganz ahnliche Beziehungen, eine Versuchsreihe mit Vibrio Metschnikoff, die genau ausgearbeitet wurde sei hier mitgeteilt

Die Oxdyationsgeschwindigkeit wird durch folgende Konzentrationen um 30—70 % vermindert

	Gewichtsprozente	Gramm-Molekule pro Liter
Methylurethan	5,0	0,67
Athylurethan	3,5	0,4
Propylurethan	1,0	0,097
Butylurethan (iso)	0,5	0,043
Phenylurethan	0,05	0,003
Dimethylharnstoff (asym)	8,0	0,91
Diathylharnstoff (symm)	2,0	0,17
Phenylharnstoff	0,25	0,018

[1] Anderungen in der Verteilung der Molekule und nicht innerhalb der Molekule selbst

[2] Warburg, O loc cit und ferner Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305

[3] Die Versuche, mit denen Herr Dr. Usui aus Japan beschäftigt ist, werden mit intakten Leberlappchen angestellt.

Diese Hemmungen, die teils zahlenmäßig mit den für rote Blutzellen gefundenen übereinstimmen, waren, mit Ausnahme der Diäthylharnstoffhemmung, vollständig reversibel.

Experimente über Atmungsgeschwindigkeit in Bakterien werden etwas kompliziert durch die rasche Vermehrung dieser Zellen. In der von uns gewählten Anordnung konnte genau unterschieden werden zwischen Hemmung der Oxydations- und Hemmung der Zellteilungsgeschwindigkeit (siehe method. Teil I).

II.

Im Laufe der letzten 20 Jahre ist wohl die Mehrzahl der sichtbaren Lebenserscheinungen auf ihr Verhalten gegen Substanzen homologer Reihen, besonders gegen solche der aliphatischen Alkoholreihe, geprüft worden; durchweg fand man die Zunahme der Wirkungsstärke mit wachsender Zahl der (unverzweigten) Kohlenstoffatome[1].

Als nun unsere Versuche ergaben, daß die Oxydationsprozesse in lebenden Zellen nach der gleichen Regel reversibel sistiert werden, war unser erster Gedanke, daß damit die Ursache dieser merkwürdig allgemeinen Gesetzmäßigkeit aufgedeckt sei, werden doch die meisten Lebensvorgänge, wenn man die Oxydationsprozesse durch Entziehung von Sauerstoff zum Stillstand bringt, reversibel gehemmt[2]. Es wurden deshalb Messungen der Oxydationsgeschwindigkeit in narkotisierten Zellen vorgenommen. Das unerwartete Resultat war, daß eine Zelle

---

[1] Die ausführlichsten Arbeiten sind die von HANS MEYER und OVERTON aus den Jahren 1899—1901; loc. cit. — Abgesehen davon für Säugetiere JOFFROY u. SERVEAUX: Arch. de méd. exp. 1895. — BAER: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1898, S. 283. — Fische und Amphibien PICAUD: Cpt. rend. 124. — BRADBURY: Brit. med. journ. 1899, S. 4. — COLOLIAN: Journ. de physiol. et de pathol. gén. 1901, S. 535. — Entwicklung von Bakterien: WIRGIN: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 46, 149. 1904. — Entwicklung der Seeigeleier: FÜHNER: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 52, 69. 1905. — Heliotropismus von Daphnien und Copepoden: LOEB, J.: Biochem. Zeitschr. 23, 93. 1910. — Sensible Nervenendigungen: RATHER: Dissertation Tübingen 1905. — Lokalanästhesie: GROS: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 62, 379. 1910. — Herzschlag: VERNON: Journ. of physiol. 43, 325. 1911. — Hemmung der Hämolyse: WALBUM: Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Orig. 7, 544. — Anhangsweise seien erwähnt Hämolyse: WIRGIN: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 46, 149. 1904. — FÜHNER u. NEUBAUER: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 56, 333. 1907. — CZAPEK: Oberflächenspannung der Plasmahaut. Jena 1911 (bei G. Fischer).

[2] Siehe auch MANSFELD, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 129, 69 und 143, 175, der an eine Löslichkeitserniedrigung für Sauerstoff in den Lipoiden denkt, wodurch der Sauerstoff langsamer in die Zellen hineindiffundieren soll. Diese Theorie steht in striktem Widerspruch zu der Tatsache, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in weiten Grenzen vom Sauerstoffdruck unabhängig ist.

in tiefer Narkose — das befruchtete Echinidenei bei völlig aufgehobener Furchung — einen fast unveränderten Sauerstoffverbrauch zeigte[1]

Allerdings war der Sauerstoffverbrauch nicht ganz unverändert, und der Einwand, daß nur ein kleiner Bruchteil der Oxydationsprozesse in ursächlichem Zusammenhang mit der Zellteilung stände, blieb bestehen. Wir haben deshalb die Frage in anderer Weise zu entscheiden gesucht, nämlich durch Beeinflussung von Lebensvorgängen, deren Unabhängigkeit von der Sauerstoffatmung erwiesen ist. Es wurde untersucht, durch welche Konzentrationen der folgenden Substanzen Vermehrung von Hefezellen bei Abschluß von Sauerstoff stark gehemmt wird. Es ergaben sich die Zahlen (method. Teil II):

Methylurethan	8 %,
Äthylurethan	4 %,
Propylurethan	2 %,
Butylurethan (iso)	1 %,
Phenylurethan	0,1 %.

Wir finden also auch hier dieselbe Regel: Zunahme der Wirksamkeit beim Aufsteigen in einer homologen Reihe.

Unser Resultat war nach einer Arbeit von REGNARD[2] recht wahrscheinlich, nach der die Gärung in lebenden Hefezellen durch homologe Alkohole nach der gleichen Regel gehemmt wird. Für die anaerob sich teilende Hefezelle ist die Gärung die Energie liefernde chemische Reaktion, und so war jedenfalls sicher, daß bei den von REGNARD angegebenen Konzentrationen keine Vermehrung mehr stattfinden konnte (womit allerdings nur eine Grenze für die anaerobe Vermehrungsmöglichkeit gesteckt war).

III.

Die biologisch wichtigen Lipoidsubstanzen der Zelle werden in der Regel als organisiert zu lipoiden Membranen angenommen und im speziellen ist ihre Rolle für chemische Vorgänge dahin gedeutet worden, daß der Zusammentritt reaktionsfähiger Stoffe in der Zelle durch diese Membranen behindert oder befördert würde[3].

Nicht allein um diese Auffassung auf ihre Richtigkeit zu prüfen, sondern um überhaupt zu entscheiden, ob unser Wirkungsgesetz in irgendeinem Zusammenhang mit der Struktur der Zelle steht, haben wir die Beeinflussung der alkoholischen Gärung studiert, als einer Reaktion, die auch getrennt von der Zelle, normalerweise aber innerhalb der Zelle vor sich geht.

---

[1] WARBURG, O.: Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305.
[2] REGNARD: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 9 sér., **10**, 171. 1889.
[3] Z. B. E. BUCHNER: Die Zymasegärung, S. 171. München u. Berlin 1903.

Daß Unterschiede in dem Verhalten von Zellgarung und zellfreier Garung gegen verschiedene Substanzen, wie Toluol, Chloroform, Thymol, existieren, hat BUCHNER[1] bald nach Entdeckung der zellfreien Gärung festgestellt. Die drei fur Fermentstudien am haufigsten verwendeten Substanzen sind sehr schwer losliche Korper, die etwa mit den Endgliedern unserer homologen Reihen korrespondieren Da sie auf die zellfreie Garung kaum oder gar nicht wirken, war in der Tat zu erwarten, daß unser Wirkungsgesetz fur die zellfreie Garung nicht gelten wurde.

Diese Vermutung hat sich durchaus nicht bestatigt Hohere Glieder einer homologen Reihe wirken auf die Preßsaftgarung starker hemmend als niedere

Die folgenden Substanzen wurden auf ihre Fahigkeit, die Zymasegarung zu hemmen, gepruft, die Wirkungsstarke wachst sehr erheblich in der Richtung der Pfeile, in ganz ahnlichem Umfang, wie wir es bisher fur Hemmung chemischer Reaktionen in lebenden Zellen konstatieren konnten

Urethane:

Athylurethan
Propylurethan
↓ Butylurethan (iso)

Alkohole:

Methylalkohol
Äthylalkohol
Propylalkohol
Butylalkohol (iso)
↓ Amylalkohol (Garungs-)

Nitrile.

Acetonitril
Propionitril
↓ Valeronitril (iso)

Ketone:

Aceton
Methylpropylketon
↓ Methylphenylketon

Beispielsweise wirkt eine funffach normale Methylalkohollosung schwacher als eine $\frac{2}{10}$ normale Amylalkohollosung usw (Genaueres siehe methodischer Teil III)

Im Anschluß daran mussen wir eine, wie uns scheint, wichtige Beobachtung erwahnen. Mischt man namlich Hefepreßsaft mit den Substanzen der angefuhrten Reihen, so sieht man, daß die Fahigkeit, Niederschlage hervorzurufen, in ganz ausgesprochener Weise beim Aufsteigen in der Reihe wachst Die Niederschlagsbildung, von der wir sprechen, ist nicht etwa geringfugig, sondern die vorher durchsichtige und nur wenig opake Flussigkeit wird ganzlich undurchsichtig und erscheint in auffallendem Licht weiß

Die Unterschiede in der „fallenden Kraft" der verschiedenen Substanzen sind von der gleichen Großenordnung wie die Unterschiede in der Wirkung auf lebende Zellen

[1] loc. cit — Siehe auch HANS EULER u SIXTEN KULLBERG Über das Verhalten freier und an Protoplasma gebundener Hefeenzyme Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem 73, 85.

Die absoluten Werte der niederschlagsbildenden Konzentrationen liegen nicht sehr weit uber denen, die zur Hemmung der Oxydationsvorgange in lebenden Zellen notig sind, sondern fallen teilweise mit diesen zusammen[1]. Wir stoßen hier also auf eine sichtbare Veranderung in dem flussigen Inhalt des Zelleibes unter dem Einfluß chemisch indifferenter Substanzen, eine Veranderung, deren Zusammenhang mit chemischen Reaktionsbeeinflussungen jedenfalls sehr anschaulich sein durfte

Auf Niederschlagsbildung im Hefepreßsaft unter dem Einfluß antiseptischer Substanzen, Sublimat, Chloroform, Phenol, Chloralhydrat, ist von E Buchner und seinen Mitarbeitern[2] haufig hingewiesen worden. Nicht bekannt aber war bisher der Zusammenhang der Niederschlagsbildung mit unserem Wirkungsgesetz

Die Beobachtungen erinnern an die Theorie von Claude-Bernard[3], nach der „Semi-Koagulationen" Ursache der Narkose sein sollten Overton hat diese Hypothese nicht vollig abgelehnt, sich ihr fur die basischen Substanzen und Oxybenzole angeschlossen, fur die indifferenten Stoffe jedoch der Claude-Bernardschen Hypothese seine Lipoidtheorie gegenubergestellt Beide Theorien wurden gewissermaßen vereinigt von Hober[4], der als Vorbedingung eine bestimmte Ansammlung in den Lipoiden ansieht, die dann weiterhin eine Verdichtung der Kolloide zur Folge haben sollte

IIIa.

Die Versuche mit Hefepreßsaft beweisen, daß Beeinflussungen biochemischer Reaktionen in einer strukturlosen Flussigkeit von der gleichen Regel beherrscht werden konnen wie in der lebenden Zelle. Wir haben uns weiter gefragt, ob die Lipoidstoffe der Zelle es sind, durch deren Zustandsanderung die Hemmungen hervorgerufen werden, oder ob die Regel auch gilt, wenn eine Beteiligung von Lipoidstoffen nicht angenommen zu werden braucht

[1] Die sichtbare Niederschlagsbildung ist von einer ganzen Anzahl Faktoren abhangig, wir beabsichtigen, den fur uns wichtigsten Faktor, die Zusammenballung der Teilchen, zu isolieren Uber Fallung von Kolloiden durch Nichtleiter ist bisher wenig bekannt Spiro bemerkte (Hofmeisters Beitr 4, 317), daß hohere Alkohole der Fettreihe Huhnereiweiß starker fallen als niedrige Vgl auch Moore u Roaf Proc. of the roy soc of London, Ser B 74, 382, 77, 86 — Brunton and Martin Journ of physiol 12, 1 — Schorr Biochem. Zeitschr 37, 426

[2] Buchner, E, H Buchner u M Hahn Die Zymasegarung — Buchner, E. u. Hoffmann. Biochem Zeitschr 4, 227 — Duchacek, Franz Biochem Zeitschr. 18, 211

[3] Claude-Bernard Leçons sur les Anesthésiques, Cinquième Leçon Paris 1875

[4] Hober: Physikalische Chemie der Zelle. 1911, S 490.

Wenn man Hefezellen in Aceton einträgt, sie dann absaugt und mit Äther und Aceton wäscht, so resultiert ein steriles Pulver, das sehr kräftige Gärwirkung zeigt Diese sogenannte Acetondauerhefe, deren Darstellung von ALBERT, BUCHNER und RAPP[1] angegeben wurde, bildet ein geeignetes Objekt zur Prüfung unserer Frage, da durch die Behandlung mit Aceton und Äther die Lipoide wohl größtenteils ausgelaugt werden Wir haben gefunden, daß die Gärwirkung der Acetondauerhefe nach der gleichen Regel gehemmt wird; als Belege seien die Konzentrationen einiger Stoffe angeführt, die eine fast vollständige Gärungshemmung[2] bewirken

Substanz	Gewichtsprozente	Gramm-Moleküle pro Liter
Methylalkohol . .	mehr als 16	mehr als 5,0
Äthylakohol .	16	3,5
Propylalkohol (n). .	8	1,3
Butylalkohol (iso) . .	4	0,54
Amylalkohol (Gärungs-)	2	0,23
Aceton	16	2,8
Methylpropylketon .	4	0,47
Acetonitril .	8	2,0
Propionitril	4	0,73
Methylurethan . . .	10	2,1
Äthylurethan . .	6	0,68
Propylurethan . . .	3	0,28

IV.

Auf die Bedeutung der Verteilung einer Substanz zwischen Zellen und umspülender Flüssigkeit ist zuerst von EHRLICH hingewiesen worden HANS MEYER und OVERTON[3] haben dann in ihrer berühmten Theorie der Narkose die Zellbestandteile, in denen eine große Zahl von Stoffen fixiert oder angereichert werden müssen, um zu wirken, chemisch charakterisiert, so daß es möglich sein sollte, aus bekannten physikalisch-chemischen Eigenschaften einer Substanz ihre Wirkungsstärke vorauszusagen

Die Theorie sagt nicht, daß z B Aceton deshalb narkotisch wirkt, weil es sich in den Gehirnlipoiden anhäuft, sondern nur Ein hoher molekulares Keton wirkt deshalb stärker als Aceton, weil von dem ersten bei gleichen Konzentrationen in der umspülenden Lösung sich mehr

[1] ALBERT, R, E BUCHNER u R. RAPP. Ber. d dtsch. chem Ges 35, 2376. 1902. — BUCHNER u. HAHN: Die Zymasegärung S. 247

[2] 2 g Acetondauerhefe + 10 ccm einer 10proz. Rohrzuckerlösung wurden bei 30° eine Stunde digeriert Von dieser Suspension wurden Proben mit oder ohne Zusatz der hemmenden Substanzen zwei bis drei Stunden bei 30° in Eudiometerröhrchen beobachtet.

[3] loc cit.

in den Zellipoiden befindet als von dem letzten. Will man demnach nicht ganz enorm hohe Teilungsverhältnisse für stark wirksame Substanzen annehmen, so wäre zu erwarten, daß von Körpern, wie Aceton und Äthylalkohol stets weniger, von Körpern, wie Hypnon, Phenylurethan usw., stets mehr in den Zellipoiden und demnach auch in der ganzen Zelle ist als in der umspülenden Lösung.

Damit stehen nun die wenigen Bestimmungen, die bisher nach dieser Richtung ausgeführt wurden, nicht in Einklang. Zwar fanden Pohl[1] mehr Chloroform, Hedin[2] mehr Äther und Säureester in den Zellen als in der umspülenden Flüssigkeit, andererseits aber wurde das gleiche für schwach wirksame Substanzen, wie Aceton (Hedin[2] und Archangelsky[3]) und Alkohol (Gréhant[4]), gefunden und nach Hedin[2] verteilen sich Methylalkohol und Amylalkohol gleichmäßig auf Zellen und umspülende Salzlösung.

Eine weitere Unsicherheit, auf die von Hans Meyer und Overton selbst hingewiesen wurde, besteht in der häufig doch sehr erheblichen Divergenz der tatsächlichen Wirkungsstärken mit den aus dem Teilungsverhältnis berechneten. Um ein Beispiel herauszugreifen, mußte Isobutylalkohol 180mal so stark wie Äthylalkohol wirken. Er wirkt aber nur 3- bis 4mal so stark. Die Erklärung sehen die Begründer der Lipoidtheorie darin, daß wir die Lösungseigenschaften der Zellipoide nicht kennen.

Zum Teil die hier bestehenden Abweichungen und Widersprüche waren es, die uns veranlaßten, Verteilungsmessungen mit lebenden Zellen anzustellen[5]. Untersucht wurde die Verteilung folgender Substanzen: Methylalkohol, Äthylalkohol, Propyalkohol, Isobutylalkohol, Amylalkohol, Methylurethan, Diäthylharnstoff, Butylurethan, Phenylurethan, Methylphenylketon, Aceton, Thymol, Formaldehyd und Blausäure. Als Material wurden rote Vogelblutzellen benutzt, die in möglichst konzentrierter Suspension, suspendiert in einer 0,9proz. Natriumchloridlösung, vermischt wurden mit einer 0,9proz. Natriumchloridlösung, die die zu prüfende Substanz enthielt. Bei leichtlöslichen Substanzen bestimmten wir die Verteilung, wie Hedin[6], durch Messung des Gefrierpunkts vor und nach dem Vermischen. Bei den schwerlöslichen -- es handelte sich um wenige Kubikzentimeter äußerst

[1] Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 28, 239. 1891.

[2] Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 68, 229.

[3] Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 46, 347. 1901.

[4] Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1899, p. 746.

[5] Wie weit die Verteilung, als ursächlicher Faktor, für die chemischen Reaktionsbeeinflussungen in Betracht kommt, ist eine Frage, von der wir hier ganz absehen.

[6] loc. cit.

verdunnter Lösungen — standen geeignete chemische Methoden nicht zur Verfugung. Wir gingen deshalb so vor, daß wir aus der Atmung der Zellen, die wir zum Verteilungsversuch benutzten, die Konzentrationen der Substanzen in der umspulenden Flüssigkeit berechneten. Im einzelnen gestaltet sich die Methode, die einer allgemeinen Anwendung fahig erscheint, folgendermaßen: 2,5 ccm einer Zellsuspension werden in drei bekannten Konzentrationen einer Substanz mit großen Mengen Lösung bis zum Gleichgewicht gewaschen und schließlich auf 5 ccm aufgefullt. Weiterhin werden 2,5 ccm derselben Suspension mit verschiedenen Mengen einer Losung vermischt, die die betreffende Substanz in bekannter Konzentration enthält. Die Mischungen werden dann zentrifugiert und die Zellen gleichfalls auf 5 ccm gebracht, wobei zu beachten ist, daß zum Auffullen die durch Zentrifugieren gewonnene uberstehende Flüssigkeit benutzt werden muß. Wir haben dann schließlich sechs Rohrchen, alle gleiche Zellmengen im gleichen Volumen enthaltend, die Konzentrationen der zu prufenden Substanzen in der umspulenden Flussigkeit sind fur die ersten drei Rohrchen bekannt, fur die letzten drei unbekannt. Man bestimmt nun in allen sechs Rohrchen den Sauerstoffverbrauch, der, wie anfangs erwahnt, durch die Konzentration der hemmenden Substanz in der umspulenden Flussigkeit definiert ist, und erhalt drei Atmungsgroßen bei bekannter, drei bei unbekannter Konzentration, aus diesen Daten sind die unbekannten Konzentrationen durch Interpolation berechenbar (siehe Versuche Nr. IV).

Ein großer Vorteil der Methode ist u. a. der, daß die Verteilung bei denjenigen Konzentrationen bestimmt wird, bei denen die Stoffe wirken, daß man nicht notig hat, großere Konzentrationen als die wirksamen zu benutzen, weil solche die Zellen meist toten. Die Verteilungen sind also alle an lebenden Zellen gemessen. Das Resultat war folgendes:

1. Garungsamylalkohol und Isobutylurethan verteilen sich etwa gleichmäßig uber Zellen und Salzlosung. Dazu sei bemerkt, daß diese beiden Substanzen etwa in gleicher Konzentration die Oxydationsprozesse hemmen.

2. Substanzen von geringerer Wirkungsstarke als Amylalkohol wurden von den Blutzellen in geringerer Menge aufgenommen. 1 Volumen Zellsuspension enthielt weniger von diesen Substanzen als 1 Volumen Salzlosung. Dies wurde festgestellt fur Methyl-, Athyl-, Propyl-, Butylalkohol, Methylurethan, Diäthylharnstoff, Aceton. Von diesen wird der starker wirksame Butylalkohol reichlicher von den Zellen aufgenommen als der schwacher wirksame Äthylalkohol.

3. Von indifferenten Substanzen, die starker wirken als Amylalkohol, wurden gepruft Methylphenylketon, Phenylurethan und Thymol. Diese drei Korper haufen sich sehr stark in der Zelle an. 1 Volumen

Zellsuspension enthalt im Gleichgewicht bedeutend mehr als 1 Volumen Salzlosung. Bei Konzentrationen, die die Oxydationsprozesse um 50% hemmen, finden wir von Methylphenylketon zweimal, von Phenylurethan dreimal, von Thymol neunmal so viel in der Suspension als in der Salzlosung Etwa 50% Oxydationshemmung wird bewirkt durch 12 Millimole Methylphenylketon pro Liter, 3 Millimole Phenylurethan und 0,5 Millimole Thymol

4. Als Reprasentanten von Korpern, deren Wirkungsmechanismus von dem der indifferenten Stoffe abweicht, seien angefuhrt Formaldehyd und Blausaure Beide haufen sich stark in der Zelle an

Stellen wir einige Resultate zusammen, so laßt sich eine Reihe bilden aus 6[1] Substanzen, die mit der am schwachsten wirkenden anfangt und mit der am starksten wirksamen endigt Methylalkohol — Butylalkohol — Amylalkohol — Methylphenylketon — Phenylurethan — Thymol Je stärker ein Glied dieser Reihe wirkt, um so mehr davon finden wir im Gleichgewicht in der Zelle[2] Selbstverstandlich durfen Substanzen, wie Blausaure und Formaldehyd, in solche Reihen nicht hineingenommen werden

Wir sehen ferner, daß unsere Versuche, wie wir erwarteten, die Angaben anderer Autoren uber Anhaufung von Aceton oder Äthylalkohol nicht bestatigen konnen

Was die Lipoidtheorie anbetrifft, so ist hervorzuheben, daß keine einzige Messung gegen sie spricht, daß vieles sogar ausgezeichnet zu stimmen scheint So ist beispielsweise das Teilungsverhaltnis fur Amylalkohol zwischen Salzlosung und Zellipoiden in unseren Zellen = 1 Im Sinne der MEYER-OVERTONschen Theorie muß dann das Teilungsverhaltnis des Butylalkohols, das fur $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ von OVERTON mit 6 angegeben wird, fur $\frac{\text{Zellipoide}}{\text{Wasser}}$ kleiner als 1 sein, und in der Tat finden wir weniger Butylalkohol in der Zelle als in der Salzlosung

Wenn man das Volumen der lipoiden Phase[3] in der Zellsuspension kennen wurde, so konnte man sogar zahlenmaßige Beziehungen zwischen Wirkungsstarke und Konzentration in den Lipoiden suchen Der Weg zur Berechnung des Lipoidvolumens ware etwa folgender Das Teilungsverhaltnis des Amylalkohols fur $\frac{\text{Zellipoide}}{\text{Salzlosung}}$ ist, wie wir sahen, etwa 1, dann mußte nach der Lipoidtheorie das entsprechende Teilungsverhaltnis des Methylalkohols, berechnet nach den OVER-

[1] Die ubrigen Substanzen haben zu ahnliche Loslichkeiten, als daß Unterschiede mit unsern Methoden sicher feststellbar waren

[2] Dies gilt nur fur einen bestimmten Konzentrationsbereich, denn siehe Thymol.

[3] Wir beruhren das hier nur beilaufig, weil es sich um Tatsachen handelt, die fur die narkotische Wirkung, wahrscheinlich aber nicht fur die chemischen Reaktionsbeeinflussungen in Betracht kommen

TONschen Wirkungsstarken, ca 20 mal so klein sein, diese geringe Menge Methylalkohol, die in die Lipoide hineingeht, laßt sich fur unsere Frage vernachlassigen. Mischen wir nun 10 ccm Methylalkohol-Salzlosung mit 10 ccm Zellsuspension, so nimmt die Konzentration des Alkohols so ab, als ob mit 7,7 ccm und nicht mit 10 ccm verdunnt worden ware Das Volumen der lipoiden Phase ware demnach 10 — 7,7 = 2,3 ccm in 10 ccm unserer Zellsuspension

Eine Konsequenz ist z. B. folgende Da das Lipoidvolumen nur etwa den funften Teil der Zellsuspension ausmacht und es sich darum handelt, Konzentrationsunterschiede in diesem Bruchteil des Volumens festzustellen, so war zu erwarten, daß wir mit Hilfe unserer Methoden nur große Konzentrationsunterschiede in der Lipoidphase wurden feststellen konnen Berechnet man sich diese Konzentrationsunterschiede aus den Wirkungsstarken, so ergibt sich, daß mit unsern Methoden fur Aceton, Athylalkohol, Methylalkohol, Propylalkohol und Methylurethan annahernd das gleiche Aufnahmevermogen gefunden werden muß. Das ist, wie aus den Protokollen (s. Versuch IV) hervorgeht, tatsachlich der Fall

Als Einwand gegen diese Betrachtungsweise konnte man geltend machen, daß die Loslichkeitsbeeinflussungen durch Kolloide und andere Zellbestandteile nicht hinreichend bekannt und moglicherweise recht erheblich sind Das ist unwahrscheinlich erstens nach den Messungen von CHRISTIAN BOHR[1], der die Loslichkeiten von Stickstoff und Sauerstoff im Serum denen in einer physiologischen Kochsalzlosung sehr ahnlich fand; zweitens auf Grund der soeben mitgeteilten Messungen; andernfalls namlich mußte man annehmen, daß die Zellbestandteile der waßrigen Phase die Loslichkeit von Korpern, die in Lipoiden schwer loslich sind, erniedrigen, die der anderen aber erhöhen[2].

Storender fur Berechnungen ist zweifellos der Einfluß der Adsorption bei Stoffen, die in kleiner Konzentration wirken. Die Adsorption namlich wird hier prozentisch in Betracht kommen, weil bei kleinen Konzentrationen relativ mehr adsorbiert wird, und weil die starker wirksamen Stoffe auch zu den starker adsorbierbaren gehoren Diese Verhaltnisse finden ihren Ausdruck in unseren Messungen, nach denen sich Aceton, Methylalkohol usw. bei den fur die Oxydationshemmung in Betracht kommenden Konzentrationen nach dem HENRYschen Gesetz verteilen, während man bei Korpern, die in kleiner Konzentration wirken, erhebliche und, wie wir glauben, sehr interessante Abweichungen beobachtet (siehe Thymol unter Versuchen IV).

Versuche.

I. Stoffwechselversuche mit Bakterien

Eine 24 stundige Agarkultur des Vibrio Metschnikoff wurde in der Regel benutzt In 10 ccm Bouillon wurden 10 Ösen fein zerrieben Die Suspension kam dann sofort in Eis und konnte den Tag uber benutzt werden — Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs wurde etwa 1 ccm dieser Stammsuspension in ein 10 ccm fassendes Rohrchen gefullt; das Rohrchen hatte auf einer Seite einen eingeschliffenen Glasstopfen, auf der anderen Seite einen Glashahn Dann wurde Kochsalz-Peptonlösung[3] zugegeben, ferner 2 ccm einer konzentrierten Rinderblutkorperchen-

[1] Z. B. Nagels Handb. f. Physiol S 54

[2] Vergleiche allerdings die sonderbaren Loslichkeitsbestimmungen von Chloroform im Serum, die MOORE und ROAF (loc. cit) mitgeteilt haben

[3] 1 g Pepton Witte, 0,9 g NaCl, gekocht und filtriert Dazu 3 ccm $^n/_{10}$ NaOH. Die Flussigkeit färbt dann Neutralrot gelb, Phenolphthalein eine Spur rosa.

suspension in Kochsalz[1] und mit Kochsalz-Peptonlösung völlig aufgefüllt. Die Kochsalz-Peptonlösung war bei 37° an der Luft geschüttelt worden. Das verschlossene Röhrchen wurde nun eine passende Zeit in einem Wasserthermostaten von 37° langsam gedreht und darauf im wesentlichen, wie für andere Zellen beschrieben, der verschwundene Sauerstoff bestimmt[2]. Eine kleine methodische Modifikation erwies sich als nötig, nämlich die Bakterien sofort nach Abbrechen des Versuches zu vergiften[3]. Zu dem Zwecke wurde das Röhrchen geöffnet, mit einer langstieligen Pipette 0,5 ccm einer alkalischen Natriumcyanidlösung unterschichtet, mit einem Tropfen Wasser wieder bis zum Rand gefüllt, geschlossen und umgeschüttelt. Die alkalische Natriumcyanidlösung war: 28 g Na_2CO_3 + 10 H_2O, NaCN 0,1 g, Wasser 100.

Der Inhalt des Röhrchens wurde dann geschichtet unter 3 ccm einer Saponinlösung: Saponin 0,6 g; NaCl 1,1 g; Wasser 100, etwas Thymol; hierauf, wie früher beschrieben, weiter verfahren.

Arbeitet man, wie meistens, mit einer Serie von Röhrchen, so wird jedes Röhrchen, nachdem es mit Bakterien, Blut usw. angefüllt ist, bei offenem Hahn in eine Schale mit Eis gelegt. Erst wenn alle Röhrchen fertig sind, bringt man sie dann gleichzeitig in das Wasserbad bei 37°. In gleicher Weise beendigt man den Atmungsversuch stets so, daß man die Röhrchen aus 37° in Eis bringt. Auf diese Weise sind also die Zeiten gut fixiert[4].

Sollte die Wirkung einer Substanz auf den Stoffwechsel geprüft werden, so wurde sie in NaCl-Peptonlösung aufgelöst, die Blutkörperchen wurden dann nicht mit Natriumchlorid, sondern mit Natriumchlorid, in der die betreffende Substanz gelöst war, dreimal gewaschen. Die Bakterien wurden nie gewaschen, sondern stets in die Bouillonlösung zugegeben, wobei dann die Konzentration der Substanz in der NaCl-Peptonlösung etwas vermindert wurde. Dies wurde stets in der Angabe der Konzentration berücksichtigt[5].

Als Kontrolle wurde ein Röhrchen ohne Bakterein (also Blutkörperchen + NaCl-Pepton usw.) gleichzeitig bestimmt und der Ausschlag, den dieses Röhrchen am Manometer gab, von sämtlichen anderen subtrahiert. (Die Druckverminderung in dem Kontrollröhrchen hat ihre Ursache in der größeren Löslichkeit der Gase bei der Bestimmungstemperatur, als bei 37°, der Sättigungstemperatur. Vgl. darüber WARBURG l. c.) Unter „korrigierten Druckverminderungen" verstehen wir im folgenden stets die Werte abzüglich der Blutkontrolle. Die Schüttelflaschen hatten, wie früher, ein Volumen von 50 ccm, das Volumen der eingeführten Flüssigkeit betrug 13 ccm, so daß die Druckverminderungen in ca. 37 ccm auftraten. Eine Öse einer 24stündigen Agarkultur des Vibrio gibt unter diesen Versuchsbedingungen nach halbstündiger Atmung bei 37° ca. 50 mm (korrig.) Druckverminderung. Diese Angabe soll nur einen Anhaltspunkt für die Größenordnung geben, verglichen werden darf natürlich nur die Atmung desselben Materials, derselben Suspension.

Bei Versuchen mit Zellen, die sich rasch teilen, ist es eine gewisse Komplikation, daß die neu entstandenen Zellen die Oxydationsgröße vermehren; im

[1] Mehrmals gewaschen in 0,9% NaCl.

[2] WARBURG, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.

[3] Weil sie andernfalls während der Sauerstoffbestimmung weiteratmen.

[4] Das Vergiften mit Cyanid nimmt man zweckmäßig erst vor, wenn die Röhrchen im Eis schon abgekühlt sind.

[5] Substanzen, die sich in Zellen anhäufen, kamen nicht zur Verwendung, so daß sich die Konzentrationen ohne Fehler angeben ließen.

allgemeinen kann also eine Änderung im Sauerstoffverbrauch nicht nur von einer direkten Oxydationsbeeinflussung, sondern auch von einer Vermehrungshemmung herrühren. Wir wählten deshalb die Versuchszeiten so kurz wie möglich, durchschnittlich 25 Minuten. Innerhalb dieser Zeit kommt, unter den angegebenen Bedingungen, die Vermehrungshemmung nicht in Betracht, wie wir uns durch zahlreiche Versuche überzeugt haben. In einer Stunde kommt die Vermehrung schon deutlich, in 1¾ Stunden sehr deutlich in Betracht. Dieselbe Suspension z. B., die in 30 Minuten eine Atmung von 57 mm zeigte, ergab eine Atmung von 94 mm, nachdem sie 1¼ Stunde bei 37° gehalten war.

Der Vorrat an Sauerstoff entspricht unter unseren Bedingungen in einem Röhrchen etwa 230 mm; d. h. wenn aller Sauerstoff verbraucht würde, so erhielte man bei der Bestimmung eine Druckverminderung von 230 mm. Wir wählten die Mengen so, daß in den 25 Minuten Druckverminderungen nicht über 100—120 erhalten wurden, so daß also am Ende des Versuchs überschüssiger Sauerstoff stets noch vorhanden war.

Durch besondere Kontrolle haben wir uns überzeugt, daß der Sauerstoffverbrauch im Blut, das zu Beginn des Versuchs nur zur Hälfte gesättigt ist, dem Sauerstoffverbrauch in gesättigtem Blut gleich ist.

Eine Salzlösung, frei von organischen Substanzen, in denen die Atmung nicht sehr erheblich absinkt, haben wir bisher nicht gefunden. Dieselbe Suspension, die in NaCl-Pepton, in 25 Minuten, die Atmung 63 ergab, zeigte in NaCl allein nur die Atmung 24.

Um zu prüfen, ob eine Atmungshemmung reversibel ist, wurde z. B. 0,5 ccm der Bakteriensuspension, die in Eis war, mit 0,5 ccm einer NaCl-Peptonlösung vermischt; die Peptonlösung enthielt die Substanz in einer solchen Konzentration, daß nach dem Vermischen eine Atmungshemmung von 50% zustande kam. Diese Suspension wurde 30 Minuten bei 37° gehalten und gedreht und dann mit Kochsalzpepton und Blutkörperchen auf 10 ccm aufgefüllt, so daß die Konzentration der betreffenden Substanz jetzt nur noch ein Zehntel der atmungshemmenden, d. h. eine unwirksame war. Gleichzeitig wurden 0,5 ccm der Stammsuspension in gleicher Weise auf 10 ccm gebracht mit Blut und NaCl-Pepton. (Der NaCl-Peptonlösung war zur Sicherheit die betreffende Substanz in so geringer Konzentration zugesetzt, daß die Menge derselben in beiden Röhrchen die gleiche war.) Wir hatten dann also zwei Röhrchen, die sich nur dadurch unterschieden, daß die Vibrionen in dem einen 30 Minuten bei auf die Hälfte verminderter Oxydationsgröße, bei 37°, gelebt hatten.

Wenn die Atmungshemmung 50% beträgt, so ist die Vermehrungshemmung in der Regel stärker, so daß also auch bei dieser Anordnung die Vermehrung die Versuchsresultate nicht trübt.

Beispiele.

(p = korr. Druckverminderung; v = Volumen, in dem die Druckverminderung auftrat; t = Temperatur während der Gasbestimmung.)

Substanz	Atmungszeit in Minuten	Gasanalyse
mit 5,0% Methylurethan .	30	$v = 37$ $p = 36$ $t = 16$
ohne "	30	$v = 37$ $p = 100$ $t = 16$
mit 3,5% Äthylurethan .	20	$v = 37$ $p = 25$ $t = 17$
ohne " .	20	$v = 37$ $p = 92$ $t = 17$
mit 1,0% Propylurethan .	20	$v = 37$ $p = 37$ $t = 18$
ohne " .	20	$v = 37$ $p = 87$ $t = 18$

Substanz	Atmungszeit in Minuten	Gasanalyse
mit 0,5% Butylurethan . .	25	$v = 37$ $p = 36$ $t = 17$
ohne „ . .	25	$v = 37$ $p = 76$ $t = 17$
mit 0,05% Phenylurethan .	45	$v = 37$ $p = 22$ $t = 19$
ohne „ .	45	$v = 37$ $p = 64$ $t = 19$
mit 8,0% Dimethylharnstoff .	30	$v = 37$ $p = 47$ $t = 17$
ohne „ .	30	$v = 37$ $p = 143$ $t = 17$
mit 2,0% Diäthylharnstoff. .	30	$v = 37$ $p = 26$ $t = 17$
ohne „ .	30	$v = 37$ $p = 60$ $t = 17$
mit 0,25% Phenylharnstoff .	30	$v = 37$ $p = 30$ $t = 18$
ohne „ .	30	$v = 37$ $p = 58$ $t = 18$

Prüfung auf Reversibilität.

Substanz	Atmungszeit in Minuten	Gasanalyse
nach ½stündiger Vorbehandlung mit 5,0% Methylurethan .	30	$v = 37$ $p = 41$ $t = 16$
ohne Vorbehandlung	30	$v = 37$ $p = 43$ $t = 16$
nach ½stündiger Vorbehandlung mit 8,0% Dimethylharnstoff. .	30	$v = 37$ $p = 110$ $t = 17$
ohne Vorbehandlung . .	30	$v = 37$ $p = 111$ $t = 17$
nach ½stündiger Vorbehandlung mit 0,25% Phenylharnstoff . .	20	$v = 37$ $p = 81$ $t = 17$
ohne Vorbehandlung . . .	20	$v = 37$ $p = 86$ $t = 17$
nach ½stündiger Vorbehandlung mit 0,5% Butylurethan .	20	$v = 37$ $p = 90$ $t = 17$
ohne Vorbehandlung	20	$v = 37$ $p = 86$ $t = 17$

II. Anaerobe Vermehrung der Hefezellen.

Als Material wurden 12—24stündige Bierwurze-Agarkulturen einer gewöhnlichen Bierhefe benutzt. Die Kultur verdanken wir dem hiesigen hygienischen Institut. Eine ziemlich konzentrierte Suspension in Bierwurze wurde davon hergestellt.

Fünf Flaschen mit dreifach durchbohrten Stopfen wurden hintereinandergeschaltet. Zwei Bohrungen waren für In- und Ableitung, die dritte für einen Heber. Die Heber wurden gefüllt mit Wasser, dann kamen in jede Flasche 30 ccm Bierwurze und 0,5 ccm der Hefesuspension in Bierwurze. Hierauf wurde Wasserstoff aus einer Bombe durchgeleitet, das Gas passierte zunächst zwei Wasserflaschen mit Pyrogallol. Die erste Flasche enthielt reine Bierwurze; in der Bierwurze der vier anderen Flaschen war die zu prüfende Substanz in sinkenden Konzentrationen aufgelöst. Nach halbstündiger Durchleitung wurde, während der Durchleitung, in 10-ccm-Röhrchen abgefüllt, die auf der einen Seite einen Hahn mit Capillare, auf der anderen einen eingeschliffenen Glasstopfen trugen. In diese Röhrchen wurde so eingefüllt, daß der Heber auf den Boden reichte, die sauerstofffreie Suspension von unten zuströmte und oben mehrere Kubikzentimeter überliefen. Dann wurde luftdicht verschlossen und der Hahn mit einer mit Paraffin gefüllten und in Paraffin tauchenden Capillare gefüllt.

Nach 10 Stunden bei 25° wurde gut durchgeschüttelt, gleiche Volumina aus jedem Röhrchen kamen in ein graduiertes Rohr und wurden zentrifugiert, bis sich das Volumen nicht mehr änderte. Um Gasbildung während des Zentrifugierens zu

vermeiden, wurde vorher mit Formol vergiftet. Um den Grad der Vermehrungshemmung quantitativ beurteilen zu können, wurde eine der Suspensionen, durch die Wasserstoff geleitet war, 11—12 Stunden in Eis gehalten und dann gleichfalls in einem graduierten Röhrchen zentrifugiert. Das aus dieser Suspension erhaltene Zellvolumen entspricht der Vermehrung 0 (im folgenden als Eiskontrolle bezeichnet). Unter Volumina verstehen wir in den nachstehenden Beispielen die abgelesenen Volumina der Zentrifugate:

1. Eiskontrolle. 2; Bierwürze: 6; 8% Methylurethan: 4.
2. Eiskontrolle. 5; Bierwürze· 10; 4% Äthylurethan: 6; 2% Äthylurethan: 9
3. Eiskontrolle: 1; Bierwürze: 3, 2% Propylurethan: 1,5.
4. Eiskontrolle: 1; Bierwürze 3½; 1% Isobutylurethan: 1%
5. Eiskontrolle. 2; Bierwürze· 6; 0,1% Phenylurethan· 3½

III.

Der Hefepreßsaft wurde nach der Vorschrift von E Buchner aus untergariger Bierhefe einer Heidelberger Brauerei gewonnen. Die zu prüfenden Substanzen, der Mehrzahl nach Flüssigkeiten, wurden direkt dem Preßsaft unter vorsichtigem Umschütteln zugefügt, nachdem derselbe vorher mit einem Drittel seines Volumens einer 60proz Rohrzuckerlösung verdünnt worden war. Manche Preßsäfte zeigten nur schwache Gärwirkung. Wir fügten diesen 0,15% Natriumphosphat hinzu und erhielten dann in Übereinstimmung mit früheren Autoren recht wirksame Flüssigkeiten Die Mehrzahl der Versuche ist mit phosphatfreiem Preßsaft angestellt Zur Bestimmung der Gärkraft benutzten wir die von Buchner empfohlenen Eudiometerröhrchen, beurteilten also die Gärkraft aus dem Volumen der entwickelten Kohlensäure Die Preßsäfte wurden vorher meist durch Schütteln an der Luft von der Hauptmenge der aufgelösten Kohlensäure befreit, einige Male, wie das auch Buchner getan hat, ausgepumpt Sowohl die Beeinflussung der Gärkraft als auch das Auftreten der Niederschläge nach Zufügung der Substanzen ist abhängig von der Zeit der Einwirkung Die Beeinflussung der Gärkraft ist weiterhin abhängig von der Gärkraft des Saftes, so daß exakte Versuche eigentlich nur an demselben Preßsaft gewonnen werden können Diese Verhältnisse wurden so weit berücksichtigt, als verschiedene Substanzen einer homologen Reihe an demselben Preßsaft geprüft wurden. Für alle aufgeführten Substanzen aber war das naturgemäß nicht möglich, und deshalb haben wir darauf verzichtet, im allgemeinen Teil Zahlen anzugeben Wir erinnern daran, daß im Gegensatz hierzu die Wirkung der Substanzen auf die Oxydationsprozesse in lebenden Zellen eine sehr konstante und im besonderen für eine Zellart unabhängig von der absoluten Oxydationsgröße ist[1]

Alle Versuche wurden in einem Wasserthermostaten von 29° ausgeführt; die Versuchsdauer betrug 1—3 Stunden Längere Versuchs-

[1] Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 76.

zeiten hielten wir nicht für zweckmäßig, u. a. weil wir naturgemäß kein Antisepticum zusetzen durften. Die notwendige Kürze der Versuchszeiten veranlaßte uns auch, die nicht sehr exakte Eudiometermethode zu wählen. Indessen zogen wir Schlüsse nur aus sehr großen Differenzen; unter absoluter Hemmung verstehen wir das Ausbleiben jeglicher Kohlensäureentwicklung in einer Zeit, in der die Kontrolle schon das Doppelte ihres Volumens an Kohlensäure produziert hatte; unter sehr starker Hemmung etwa im Vergleich zur Kontrolle zehnmal so kleine Kohlensäureentwicklung.

Sicher ist es zweckmäßiger, wie BUCHNER hervorhebt, die zu prüfenden Substanzen schon in Wasser gelöst zuzusetzen; doch kam es uns in der Regel auf so schwer lösliche Flüssigkeiten oder Substanzen an, daß wir gezwungen waren, direkt zum Preßsaft zuzusetzen. Das gleiche taten wir dann mit den leicht löslichen, um einheitlich vorzugehen. Wie BUCHNER am Chloroform, haben auch wir verschiedentlich die Beobachtung gemacht, daß für manche schwer lösliche Stoffe eine stärkere Wirkung erzielt wird, wenn man mehr hinzugibt, als zur Sättigung notwendig ist. Für dieses merkwürdige Verhalten fehlt uns eine Erklärung, die mechanische Wirkung ungelöster Partikel kommt allein wenigstens nicht in Betracht, da bekanntlich in Gegenwart von ungelöstem Toluol starke Gärung beobachtet wird. Beispiele (stets 2 ccm Preßsaft-Rohrzucker):

1. Preßsaft mit 16%[1] Methylalkohol, 16% Äthylalkohol, 2% Amylalkohol wurde angesetzt. Nach 2 Stunden bei 30° hatte sich in der Amylalkoholprobe kein Gas gebildet, in der Äthylalkoholprobe eine sehr geringe, in der Methylalkoholprobe eine sehr erhebliche Menge. Die Amylalkoholprobe war gänzlich opak und undurchsichtig, die Methylalkoholprobe nur schwach getrübt.

2. Preßsaft mit 8% Methylalkohol, 0,8% Methylphenylketon, 1,6% Valeronitril wurde angesetzt. Nach 1 Stunde war die Methylalkoholprobe so durchsichtig wie die Kontrolle ohne Zusatz einer Substanz und hatte etwa 1½ ccm Kohlensäure entwickelt. In den beiden andern Proben fanden sich nur wenige Zehntelkubikzentimeter Kohlensäure, und das Methylphenylketon hatte eine völlige Trübung hervorgerufen, 1 Stunde später hatte sich das Verhältnis nur dahin geändert, daß auch die Valeronitrilprobe sich zu trüben begann.

3. Preßsaft mit 16% Aceton, 8% Aceton und 0,8% Methylphenylketon wurde angesetzt. Nach 1 Stunde hatten 16% Aceton und 0,8% Methylphenylketon die Flüssigkeit völlig getrübt. 8% Aceton dagegen ließ keinen Unterschied gegen die Kontrolle mit reinem Preßsaft er-

---

[1] Gewichtsprozente.

kennen. Nach 3 Stunden war auch in 8 % Aceton eine Fallung aufgetreten. Kohlensaure hatte sich in 8 % Aceton in erheblichen Mengen entwickelt, dagegen nur wenig in den beiden andern Proben 16 % Aceton und 0,8 % Methylphenylketon ubten also die gleiche Wirkung auf den Preßsaft aus, sowohl was Niederschlagsbildung als auch was Garungshemmung anbetrifft

4 Preßsaft mit 6 % Äthylurethan, 5 % Propylurethan und 3 % Propylurethan wurde angesetzt 5 % Propylurethan erzeugte sofort eine dicke Fallung, wahrend die beiden andern Proben zunächst unverandert blieben Nach 2 Stunden bei 30° waren auch in 3 % Propylurethan und 6 % Äthylurethan Fallungen aufgetreten. Die Garungshemmung in 6 % Propylurethan war absolut, in den beiden andern hatte sich Gas entwickelt, allerdings bedeutend weniger als in der Kontrolle mit reinem Preßsaft. 6 % Äthylurethan und 3 % Propylurethan wirken also gleich, sowohl was Niederschlagsbildung als auch was Gärungshemmung anbetrifft

5. Preßsaft wurde angesetzt mit 8 % Acetonitril, 4 % Acetonitril, 16 % Aceton, 8 % Aceton Nach 1 Stunde hatten 8 % Acetonitril und 16 % Aceton starke Fallungen erzeugt und nur sehr geringe Kohlensauremengen entwickelt Die ubrigen Proben waren unverandert im Aussehen und zeigten starke Garwirkung.

Derartige Beispiele ließen sich beliebig vermehren, Butylurethan wirkt starker als Propylurethan usw. Vergleicht man die Reihenfolge, in der diese Substanzen die Oxydationen in lebenden Zellen einerseits, die Preßsaftgarung andererseits hemmen, so ist sie ausnahmslos die gleiche

IV

Für Verteilungsversuche muß die Zellsuspension so konzentriert wie moglich sein, weil die Ausschlage bei konzentrierten Suspensionen großer sind Das Volumen der Zellen in unseren Suspensionen betrug etwa vier Funftel des Gesamtvolumens — Die Suspensionsflussigkeit war eine 0,9proz Natriumchloridlosung, in der die Zellen mehrmals gewaschen waren, vor jedem Zentrifugieren wurde einige Minuten kraftig geschuttelt Die Zellen sollen nach dem Waschen und Schutteln möglichst frei von dissoziabler Kohlensaure sein, andernfalls geht beim Vermischen mit Salzlosung Kohlensaure in merklichen Mengen heraus und kann die Messungen storen Kohlensauredissoziation, geringe und beim Arbeiten mit sehr konzentrierten Suspensionen nie ganz vermeidbare Hamolyse haben uns veranlaßt, von prazisionskryoskopischen Messungen abzusehen und den gewöhnlichen Beckmannschen Apparat zu benutzen Der Fehler beträgt hier etwa ein Hundertstelgrad. Wurden 10 ccm unserer konzentrierten Zellsuspension mit 10 ccm

0,9proz Natriumchloridlösung vermischt und zentrifugiert, so hatte sich der Gefrierpunkt der überstehenden Flüssigkeit nicht geändert.

Für alle kryoskopischen Bestimmungen wurden 10 ccm konzentrierte Zellsuspensionen mit 10 ccm 0,9proz Natriumchloridlösung, der die zu prüfende Substanz zugesetzt war, vermischt, ca 5 Minuten[1] vorsichtig bewegt, zentrifugiert und in der überstehenden Flüssigkeit die Gefrierpunktserniedrigung bestimmt, die schon vorher für die zugesetzte Flüssigkeit gemessen war. Im folgenden ist die Gefrierpunktserniedrigung vor und nach dem Mischen angegeben. Ist sie nach dem Mischen auf die Hälfte[2] gesunken, so hat sich die Substanz gleichmäßig verteilt Ist sie auf weniger als die Hälfte gesunken, so ist weniger in der Zellsuspension als in der umspülenden Flüssigkeit. Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gefrierpunktserniedrigung vor dem Mischen}}{\text{Gefrierpunktserniedrigung nach dem Mischen}}$$

im folgenden als $\frac{C_1}{C_2}$ bezeichnet, ist dann ein anschaulicher Ausdruck für das Aufnahmevermögen der Zellen

Δ ist die Gefrierpunktserniedrigung, die die betreffende Substanz in der physiologischen Kochsalzlösung hervorbrachte, in Graden

Substanz	Δ vorher	Δ nachher	$\frac{C_1}{C_2}$
Methylalkohol	1,91	1,08	1,77,
Äthylakohol	1,94	1,13	1,72,
n-Propylalkohol	1,27	0,73	1,74
(iso-)Butylakohol	1,02	0,57	1,8,
Amylalkohol[3]	0,360	0,186	2,
Methylurethan	0,963	0,542	1,77,
Diäthylharnstoff	0,946	0,542	1,76
Butylurethan a)	0,194	0,083	2,3,
b)	0,19	0,10	1,9,
c)	0,18	0,088	2,0

[1] Nach dieser Zeit ist stets Gleichgewicht erreicht, wie wir uns durch mehrere Kontrollversuche überzeugt haben.

[2] Für die in Betracht kommenden Konzentrationen darf Proportionalität mit den Gefrierpunktsdepressionen angenommen werden.

[3] Gärungs

Am ungenauesten wird die Bestimmung für Butylurethan, weil die Löslichkeit dieser Substanz zu gering ist und der Fehler von ein Hundertstelgrad prozentisch schon viel ausmacht. Deshalb sind drei Bestimmungen angeführt, als deren Mittel sich etwa 2,1 ergibt.

Verteilungsmessung mit der Atmungsmethode.

Phenylurethan.

a) 2,5 ccm konzentrierte Zellsuspension in 0,9% NaCl mit 0,1% und 0,05% Phenylurethan (in 0,9% NaCl) bis zum Gleichgewicht gewaschen, eine Kontrollprobe mit 0,9% NaCl ebensooft und ebenso lange gewaschen. Dann auf 5 ccm aufgefüllt und die Röhrchen in Eis;

b) eine 0,1proz. Phenylurethanlösung (in 0,9% NaCl) mit 2,5 ccm der gleichen Zellsuspension vermischt, und zwar

1. 2,5 ccm mit 5,0 ccm 0,1% Phenylurethan,
2. 2,5 „ „ 10,0 „ 0,1% „ ,

dann zentrifugiert und auf 5 ccm gebracht (zum Überspülen in die Atmungsgläschen die beim Zentrifugieren gewonnene überstehende Flüssigkeit verwendet);

c) 2,5 ccm derselben Suspension mit KCN vergiftet, auf 5 ccm gebracht und die Druckverminderung bestimmt. Diese Probe ist die Kontrolle für die O_2-Bestimmung. Genaueres darüber siehe Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 76.

Hierauf kamen die fünf Röhrchen (drei von a und zwei von b) gleichzeitig in den Wasserthermostaten von 30°, wo sie 2 Stunden blieben. Der in dieser Zeit verschwundene Sauerstoff wurde genau, wie beschrieben (Hoppe-Seyler Bd. 76), bestimmt. Das Volumen der Schüttelflasche war, abzüglich der eingefüllten Flüssigkeiten, 32 ccm (eingefüllt 5 ccm Zellsuspension und 3 ccm Saponin-Ammoniak). Wie immer, sind unter diesen Bedingungen die korrigierten Druckverminderungen ein direktes Maß der Oxydationsgrößen. Es wurde erhalten

für die Röhrchen a	NaCl	$p = -185$
	0,1% Ph	$p = -\ 35$
	0,05% „	$p = -\ 94$
„ „ „	b. 1	$p = -112$
	2	$p = -\ 83$

Durch Interpolation berechnen sich aus den Zahlen der a-Röhrchen die Konzentrationen in der umspülenden Flüssigkeit für die b-Röhrchen und zwar für Nr. 1 0,041% und für Nr. 2 0,058%. Das heißt also: Wenn wir 2,5 ccm Zellsuspension[1] mit 5 ccm 0,1% Phenylurethan

[1] Die konzentrierte „Zellsuspension", erhalten durch Zentrifugieren in einer Runneschen Zentrifuge und Abhebern der überstehenden Flüssigkeit, hat, wie

vermischen, so ist die Konzentration des Phenylurethans in der umspülenden Flüssigkeit nach dem Mischen nicht 0,07%, wie man bei gleichmäßiger Verteilung erwarten sollte, sondern 0,041%, wenn wir 2,5 ccm Zellsuspension mit 10 ccm 0,1% Phenylurethan vermischen, so ist die Konzentration nach dem Vermischen nicht 0,08%, sondern 0,058%. Die Berechnung der Verteilung gestaltet sich nun folgendermaßen weiter:

Für Nr. 1: In 5 ccm waren vorher:	$5 \times 0{,}001$ g	= 0,0050 g
„ 5 „ „ nach dem Mischen:	$5 \times 0{,}00041$ g	= 0,0021 g
Verschwunden in 2,5 ccm Zellsuspension		= 0,0029 g

Im Gleichgewicht sind mithin in 2,5 ccm Zellsuspension 0,0029 g, in 2,5 ccm umspülender Lösung 0,00105 g, also im gleichen Volumen 2,8 mal so viel als in der umspülenden Flüssigkeit.

In derselben Weise berechnet sich für Nr. 2, daß im Gleichgewicht in 2,5 ccm Zellsuspension 2,8 mal so viel Phenylurethan ist, als in 2,5 ccm umspülender Flüssigkeit.

Im folgenden sind die Rechnungen nicht in extenso mitgeteilt, sondern nur die Oxydationsgrößen (mit p bezeichnet), die in den bekannten und unbekannten Konzentrationen beobachtet wurden, und schließlich das Resultat der Berechnung, die ganz in der gleichen Weise wie bei Phenylurethan vorgenommen wurde.

Thymol.

Bekannte Konzentrationen (dreimal mit 50 ccm gewaschen).

0,015%	$p = 10$
0,0075%	$p = 79$
0,0038%	$p = 117$
NaCl	$p = 141$

Unbekannte Konzentrationen.

1.	2,5 ccm Zellsuspension	10 ccm	0,015%	p 125
2.	2,5 „ „	+ 26 „	0,015%	p 27
3.	2,5 „ „	+ 43 „	0,015%	p 11
4.	— „	+ 43 „	NaCl	p = 145

Daraus berechnet sich, daß bei 0,013% in der Außenflüssigkeit zirka zweimal so viel im gleichen Volumen Zellsuspension ist, bei 0,0032% aber zwölfmal so viel.

In einem zweiten Versuch war das Resultat das gleiche, nämlich bei

0,0032%	in der Außenflüssigkeit	15 mal	so viel in der Suspension,
0,0062%	„ „ „	9 mal	„ „ „ „ „
0,0120%	„ „ „	2 mal	„ „ „ „ „

Bestimmungen des Zellvolumens zeigten, eine sehr konstante Zusammensetzung. Die Kenntnis des Zellvolumens ist für unsere Frage nicht notwendig.

Methylphenylketon.
Bekannte Konzentrationen:

0,2 %	$p = 14$
0,1 %	$p = 113$
0,05 %	$p = 127$
NaCl	$p = 139$

Unbekannte Konzentrationen:

1.	2,5 ccm	Suspension	+ 5,0 ccm	0,2 proz. Keton:		$p = 116$
2.	2,5 „	„	+ 10,0 „	0,2 proz.	„	$p = 77$
3.	2,5 „	„	+ 10,0 „	NaCl		$p = 149$

Daraus berechnet sich, daß bei 0,104% in der Außenflüssigkeit 1,9 mal so viel in dem gleichen Volumen Zellsuspension ist, bei 0,14% 1,7 mal so viel.

Bezüglich der Sauerstoffbestimmungen ist zu beachten, daß bei der hohen Konzentration der Zellen die Formelemente im lackierten Blut atmen, trotz Anwesenheit von NH_3 und Saponin, daß man also nicht zu langsam arbeiten darf. (Vgl. Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. 70, S. 413 und Bd. 76.)

Die Kosten dieser Arbeit wurden teilweise aus einem Stipendium bestritten, das uns aus der Jagor-Stiftung in Berlin zur Verfügung gestellt war.

Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 155, 547. 1914

Über Verbrennung der Oxalsäure an Blutkohle und die Hemmung dieser Reaktion durch indifferente Narkotica.

Von

Otto Warburg.

(Aus der medizinischen Klinik in Heidelberg.)

Mit 2 Abbildungen.

Ordnet man die indifferenten Narkotica erstens aufsteigend nach ihren narkotischen Wirkungsstärken, zweitens aufsteigend nach ihren Teilungskoeffizienten[1] zwischen Öl und Wasser, drittens aufsteigend nach ihrer Capillaraktivität[2], so erhält man ziemlich ähnliche Reihen. Narkotische Wirkungsstärke, Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ und Capillaraktivität sind also Größen, die ziemlich parallel wachsen. Die Regel gilt nur in ganz roher Annäherung, es besteht nicht im entferntesten der Satz, daß Stoffe von gleicher narkotischer Wirkungsstärke gleiches Teilungsverhältnis oder gleiche Capillaraktivität besitzen.

Der Parallelismus zwischen narkotischer Wirkungsstärke und Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ ist das Fundament der Lipoidtheorie, nach H. Meyer und Overton tritt dann Narkose ein, wenn die Konzentration des Narkoticums in den Zellipoiden einen gewissen Betrag erreicht hat. Demgegenüber vertritt J. Traube seit Jahren die Auffassung, daß die Wirkung der Narkotica nicht auf ihrer Lipoidlöslichkeit, sondern auf ihrer Capillaraktivität beruhe. —

Wie früher gezeigt wurde[3], verlangsamen die indifferenten Narkotica die Oxydationsgeschwindigkeit sauerstoffatmender Zellen, die Konzentrationen, die zur Oxydationshemmung erforderlich sind, liegen erheblich höher als die zur Gehirnnarkose erforderlichen, die Reihenfolge der nach ihren Wirkungsstärken geordneten Stoffe ist für

---

[1] Meyer, Hans, Schmiedebergs Arch. 42, 109, und Baum, Schmiedebergs Arch. 42, 119; 46, 338. — Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

[2] Traube, J., Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 140, 109. 1911, hier sind auch frühere Arbeiten Traubes zitiert; ferner Traube, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 153, 276. 1913.

[3] Warburg, O., Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 452. 1910. Mit späteren Arbeiten zusammengefaßt in Asher-Spiro: Ergebn. 14.

Oxydationshemmung und Gehirnnarkose die gleiche. Auch die oxydationshemmenden Wirkungsstärken wachsen also mit dem Teilungsverhältnis $\frac{\text{Öl}}{\text{Wasser}}$ und mit der Capillaraktivität.

Solange wir weiter nichts wissen, als daß die Wirkungsstärken in einem gewissen Parallelismus zu den angeführten Eigenschaften stehen, wird eine noch so häufige Diskussion nicht entscheiden, ob der springende Punkt die Lipoidlöslichkeit, die Capillaraktivität oder möglicherweise eine Eigenschaft ist, auf die bisher die Aufmerksamkeit noch nicht gelenkt wurde. In der Tat wissen wir heute hinsichtlich der Gehirnnarkose nichts, was eine Entscheidung ermöglichte.

Anders steht es mit der Verlangsamung der Oxydationsgeschwindigkeit. Ursprünglich auf dem Boden der Lipoidtheorie stehend[1], wurde ich bald durch eine Reihe von Beobachtungen zweifelhaft und schlug deshalb vor[2], die Entscheidung zugunsten oder ungunsten der Lipoidtheorie zu vertagen. Seitdem ist der Mechanismus der Oxydationshemmungen bis zu einem gewissen Grad verständlich geworden[3]. Wir wissen heute, daß unter dem Einfluß der Narkotica die Fermente ausgeflockt oder ihre aktiven Oberflächen verkleinert werden. Wir wissen weiterhin, daß die Narkotica sich an den Verbrennungsorten der Zelle anreichern, worauf höchstwahrscheinlich die stärkere Wirkung der Narkotica auf Fermentreaktionen innerhalb der Zelle beruht. Wir wissen endlich, für einige Narkotica wenigstens, daß eine Anreicherung auch nach Entfernung der Lipoide stattfindet: alles Tatsachen, die zur Lipoidtheorie nur unter Aufstellung weiterer Hypothesen passen, auf Grund der TRAUBEschen Auffassung jedoch zwanglos erklärt werden können.

Ich stehe heute auf dem Standpunkt, daß nicht die Lipoidlöslichkeit, sondern die Capillaraktivität diejenige Eigenschaft ist, die die oxydationshemmende Wirkung der Narkotica bedingt. Die Verbrennungen in sauerstoffatmenden Zellen sind Oxydationskatalysen an Oberflächen und werden durch indifferente Narkotica gehemmt, weil sich diese Stoffe an den Oberflächen anreichern[4] und hier das Adsorptionsmilieu verändern.

Im folgenden soll nun ein Modell beschrieben werden, an dem sich demonstrieren läßt, wie indifferente Narkotica chemische Um-

---

[1] Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 452.

[2] Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465.

[3] WARBURG, O. in ASHER-SPIRO: Ergebn. d. Physiol. l. c.

[4] Diese Oberflächen können natürlich aus verschiedenem Material, Eiweiß, Nukleoproteiden, Lipoiden oder anderen Stoffen bestehen, darüber läßt sich heute mit Gewißheit nichts aussagen.

satzgeschwindigkeiten verlangsamen auf Grund ihrer Eigenschaft, an Oberflächen zu gehen. Es wird gezeigt werden, daß Oxalsäure bei 38° an der Oberfläche von Blutkohle zu Kohlensäure und Wasser verbrennt, und daß die Geschwindigkeit dieser Reaktion in ähnlicher Weise durch indifferente Narkotica verlangsamt wird, wie die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen.

Daneben wurden auch andere Oxydationskatalysen auf ihr Verhalten gegenüber undifferenten Narkotica geprüft, besonders auch die Oxydationsbeschleunigung des Lecithins durch Eisensalz, die von THUNBERG[1] zuerst beobachtet wurde und nach neueren Feststellungen im Mechanismus sauerstoffatmender Zellen eine Rolle spielt[2]. Eine Beeinflussung der Geschwindigkeit dieser Reaktion durch indifferente Narkotica in Konzentrationen, wie sie biologisch in Betracht kommen, konnte nicht festgestellt werden. Auch dieses negative Resultat ist im Zusammenhang mit unseren obigen Ausführungen bemerkenswert, gehört doch Lecithin zu den wesentlichsten Bestandteilen der „Zelllipoide“.

I. Die Verbrennung der Oxalsäure an Blutkohle.

Daß fein verteilte Kohle Oxydationen beschleunigt, ist schon seit langer Zeit bekannt. Zur Demonstration in der Vorlesung empfahl A. W. v. HOFMANN[3], eine alkoholische Lösung von Leukanilin mit Kohle aufzukochen, wobei sofort die rote Farbe des Rosanilins auftritt.

Was die Oxalsäure anbetrifft, so teilte FREUNDLICH[4] die Beobachtung mit, daß beim Schütteln einer wäßrigen Säurelösung mit Kohle dauernd Säure aus der Lösung verschwindet. FREUNDLICH knüpfte an diesen Befund die Vermutung, daß die Oxalsäure an der Kohleoberfläche durch eine chemische Umsetzung zerstört wurde.

Zunächst konnte ich feststellen, daß mit Oxalsäure beladene Kohle Sauerstoff verbraucht. Verschiedene Kohlesorten mit gleichen Oxalsäurekonzentrationen im Gleichgewicht verbrauchten sehr verschiedene Mengen Sauerstoff: am meisten verbrauchte die MERCKsche Blutkohle, weniger die KAHLBAUMsche Blutkohle. Nicht nachweisbar war eine Sauerstoffzehrung bei Verwendung KAHLBAUMscher Kohle aus Rohrzucker. In der gleichen Reihenfolge standen die verschiedenen Kohlepräparate hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Oxalsäure zu adsorbieren; wurden gleiche Mengen Kohle zu gleichen Volumina gleichkonzentrierter Oxalsäure gegeben und nach 2 Minuten langem Schütteln die Oxal-

---

[1] Skandinav. Arch. f. Physiol. 24, 90. 1910.
[2] WARBURG, O. u. MEYERHOF, O. in ASHER-SPIRO: Ergebn. d. Physiol. l. c.
[3] Berlin. Ber. 7, 530. 1874.
[4] Capillarchemie S. 163. Leipzig 1909.

saurekonzentrationen in der Lösung durch Titrieren gemessen, so zeigte sich, daß die Rohrzuckerkohle fast nichts, die KAHLBAUMsche Blutkohle mehr, die MERCKsche Blutkohle bedeutend mehr Saure aus der Lösung fortgenommen hatte Zu allen im folgenden beschriebenen Versuchen wurde die MERCKsche Blutkohle (puriss mit Saure gereinigt) verwendet Das Oxalsaurepraparat war von KAHLBAUM, die angegebenen Gewichtsprozente beziehen sich auf die wasserfreie Verbindung $C_2H_2O_4$

Um für die Starke der Adsorption und fur die Oxydationsgeschwindigkeit einen Anhaltspunkt zu geben, seien folgende Zahlen angefuhrt. an 1 g Blutkohle waren, im Gleichgewicht mit einer 0,071 proz wäßrigen Oxalsaurelosung, ca 50 mg Oxalsaure (in der Ausdrucksweise FREUNDLICHS. bei einem c von 0,008 Molen pro Liter betrug das $\frac{x}{m}$ 0,56 Millimole) 1 g Blutkohle, im Gleichgewicht mit einer 0,071 proz. Oxalsaurelosung, verbrauchte bei 38° in der ersten Stunde etwa 1,1 ccm Sauerstoff, oder 50 mg Oxalsaure, die sich an 1 g Kohle befanden, verbrauchten in der ersten Stunde etwa 1,1 ccm Sauerstoff.

Die Versuche waren so angeordnet, daß stets 90 mg Kohle durch Waschen auf der Zentrifuge mit einer bekannten Oxalsaurekonzentration annahernd in Gleichgewicht gebracht wurden Bei einer Konzentration von 0,008 Molen genugte dreimaliges Waschen mit 90 ccm Losung Dann wurde in ein kleines graduiertes Zentrifugierglas ubergespult, wieder zentrifugiert, die uberstehende Flussigkeit bis auf 1 ccm abgehebert, die Kohle aufgewirbelt, die Suspension in das spater beschriebene Bestimmungsglaschen gegossen und das Zentrifugierglas mit 0,5 ccm Oxalsaurelosung nachgespult Die 0,5 ccm Spulflussigkeit kamen gleichfalls in das Bestimmungsglaschen, das also dann 90 mg Kohle in 1,5 ccm Flussigkeit enthielt oder 1,5 ccm einer 6 proz Kohlesuspension Das Bestimmungsglaschen wurde mit dem Manometer verbunden und in den Thermostaten bei ca 38° gehangt, zunachst wurde bei offenem Hahn 10 Minuten geschuttelt, bis Temperaturgleichgewicht eingetreten war und sich die Kohlesuspension mit den Gasen der Luft bei der Versuchstemperatur in Gleichgewicht gesetzt hatte Dann wurden die Hahne geschlossen und die Sauerstoffabsorptionen unter bestandigem Schutteln gemessen

Ich habe anfangs Bedenken gehabt, ob sich mit Kohle, die bekanntlich große Gasmengen aufnehmen und abgeben kann, genaue gasanalytische Versuche anstellen lassen Diese Bedenken waren unbegründet Das ließ sich feststellen durch Kontrollen, in denen mit Wasser gewaschene Kohle (je 90 mg Kohle dreimal mit 90 ccm Wasser) in gleicher Weise auf Sauerstoffzehrung gepruft wurde. Derartige Kohle gab regelmäßig beim Schutteln im Thermostaten eine geringe Druck-

verminderung, die jedoch gegen die Zehrung der mit Oxalsaure beladenen Kohle nicht in Betracht kam[1]

Oxydationsgeschwindigkeit und Konzentration.

Setzt man Kohle mit verschiedenen Oxalsaurekonzentrationen in Gleichgewicht, so stoßt man auf die merkwurdige Tatsache, daß, von einer gewissen Grenze an, die Oxydationsgeschwindigkeit mit steigenden Oxalsaurekonzentrationen sinkt In der nachstehenden graphischen Darstellung sind auf der Abszisse die Zeiten in Minuten,

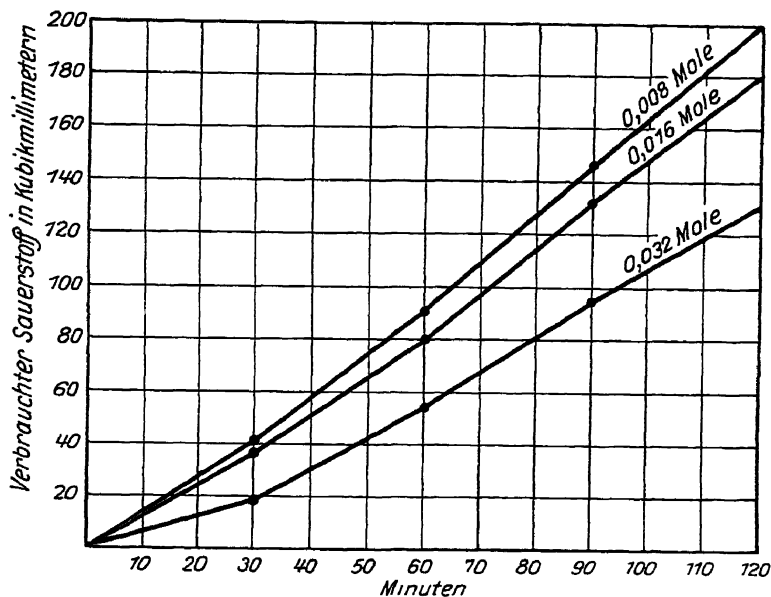



Abb 1 Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Oxalsaurekonzentrationen 38°

auf der Ordinate die verbrauchten Sauerstoffmengen in Kubikmillimetern eingetragen Man sieht daß der Sauerstoffverbrauch der Oxalsaurekohle nicht linear mit der Zeit wachst sondern daß die Oxydationsgeschwindigkeit im Laufe der ersten Stunde anwachst. Das wurde ganz regelmaßig in mehr als 50 Versuchen beobachtet Man sieht

[1] Kohle, die nicht in der angegebenen Weise mit Wasser gewaschen, sondern in wenig Flussigkeit suspendiert, eingehängt wurde, zeigte eine etwas starkere Gasaufnahme In der Tat wird durch das Waschen mit luftgesättigten Flussigkeiten die Kohle mit den Gasen der Luft in Gleichgewicht gesetzt. Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde stets, auch bei allen Kontrollen, mindestens dreimal mit 90 ccm gewaschen, bei Verwendung von 90 mg Kohle.

weiterhin, daß bei einer Konzentration von 0,008 Molen (pro Liter) die Oxydationsgeschwindigkeit betrachtlich höher ist als bei einer Konzentration von 0,016 und von 0,032 Molen Dieses Verhalten wurde verfolgt bis zu einer Konzentration von 0,8 Molen pro Liter und eine bestandige Abnahme der Oxydationsgeschwindigkeit beobachtet Eine Erklärung dieses Phanomens kann ich nicht geben, doch sei daran erinnert, daß in einer Oxalsaurelosung außer der undissoziierten Oxalsaure noch Wasserstoffionen und zwei Arten von Anionen vorkommen, daß das Verhaltnis dieser vier Körper bei verschiedenen Konzentrationen ein verschiedenes ist, und daß möglicherweise gegenseitige Adsorptionsverdrängungen eine Rolle spielen

Der Temperaturkoeffizient

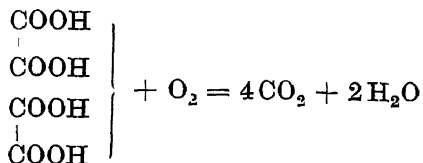
Je 90 mg Kohle, die im Gleichgewicht waren mit einer Oxalsaurekonzentration von 0,008 Molen, wurden in 6proz Suspension bei 37,5° und bei 15,5° 80 Minuten lang geschuttelt Bei 37,5° waren nach dieser Zeit verbraucht 0,120 ccm Sauerstoff; bei 15,5° 0,023 ccm Sauerstoff Für die Temperaturdifferenz von 22° ist also das Verhaltnis der Geschwindigkeiten 5,2, woraus sich fur das Intervall von 10° ein Koeffizient von 2,1 berechnet

Dieser Wert ist nur ein Annaherungswert, weil, wie oben erwahnt, die Geschwindigkeiten bei ein und derselben Temperatur nicht ganz konstant sind und aus den Kurven auch keine Konstanten berechnet wurden, mithin die Vorbedingung fur eine genaue Bestimmung eines Temperaturkoeffizienten nicht gegeben war Soweit aber durfte die angegebene Zahl zu verwerten sein, daß die Diffusion als geschwindigkeitsbestimmendes Moment hier ausgeschlossen werden kann Es ist das ubrigens leicht verstandlich, denn die Hauptmenge der Oxalsaure, die in dem System vorhanden ist, befindet sich ja, nach den Adsorptionsmessungen, von Anfang an an der Kohle (von den 5,6 mg Saure, die in 1,5 ccm der 6proz Kohlesuspension enthalten sind, befinden sich am Anfang des Versuchs 4,5 mg an der Kohle[1])

Die Gleichung der Verbrennung

In dem Maße, als Sauerstoff absorbiert wird, entwickelt sich bei der Reaktion Kohlensaure Wurden 90 mg Kohle, die mit einer Konzentration von 0,008 Molen auf die beschriebene Art in Gleichgewicht gebracht waren, in 6proz Suspension bei 38° 1 Stunde geschuttelt, so waren beispielsweise 0,103 ccm Sauerstoff absorbiert und 0,392 ccm Kohlensaure neu gebildet (Methodik siehe unten). Es sind das annahernd 4 Moleküle Kohlensaure auf 1 Molekul Sauerstoff (berechnet fur 4 Molekule 0,412 ccm Kohlensäure, die Differenz fallt in die Fehlergrenzen).

Auf Grund dieses Resultates ist für die Verbrennung folgende Formel aufzustellen:

$$\left.\begin{array}{c} COOH \\ | \\ COOH \\ COOH \\ | \\ COOH \end{array}\right| + O_2 = 4\,CO_2 + 2\,H_2O$$

II. Die Hemmung der Oxalsäureverbrennung durch Urethane.

Die Versuche waren so angeordnet, daß in vier Zentrifugiergläser je 90 mg Kohle gegeben wurde: in einem Glase wurde mit 0,008 molarer Oxalsäurelösung gewaschen, in den anderen drei Gläsern mit 0,008 molaren Oxalsäurelösungen, denen die zu prüfenden Urethane in verschiedenen Mengen zugesetzt waren Im übrigen wurde weiter verfahren, wie unter I beschrieben, also die Kohle schließlich in 1,5 ccm Flüssigkeit suspendiert, im Thermostaten bei 38° geschüttelt.

Zur Prüfung, ob beim Waschen mit den verschiedenen Stoffen Gleichgewicht annähernd erreicht war, bediente ich mich des TRAUBEschen Stalagmometers[1] und wusch die Kohle so lange, bis die Tropfenzahl des von der Kohle abzentrifugierten Waschwassers mit der Tropfenzahl der zu prüfenden Lösung übereinstimmte. Bei Phenylurethan — von den geprüften Substanzen diejenige, die am stärksten adsorbiert wird — war nach viermaligem Waschen mit 90 ccm Gleichgewicht erreicht wenn die Konzentration 0,05% betrug Sollte von Phenylurethan die Konzentration 0,005% geprüft werden, so wurde 6mal mit 90 ccm gewaschen und angenommen, daß Gleichgewicht erreicht war Mit Hilfe des Stalagmometers konnte das nicht mehr festgestellt werden, weil die Erniedrigung der Oberflächenspannung durch eine so kleine Menge Phenylurethan zu klein ist um eine beträchtliche Zunahme der Tropfenzahl zu verursachen Möglicherweise also war in diesem Fall noch kein Gleichgewicht erreicht Weniger als 3mal mit 90 ccm wurde in keinem Fall gewaschen

Die Hemmungen sind bei dieser Versuchsanordnung bestimmt bei konstanter Oxalsäure- und bei konstanter Sauerstoffkonzentration[2] in der Suspensionsflüssigkeit indem die Oxalsäurekonzentration 0,008 molar die Sauerstoffkonzentration durch die Sättigungskonzentration der Flüssigkeit mit Luft bei 38° gegeben war

Wenn man sich die Aufgabe stellt, die Verhältnisse des biologischen Versuches möglichst nachzuahmen, so ist diese Anordnung bezüglich

[1] TRAUBE, J, in ABDERHALDENS Biochem. Arbeitsmethoden 1912, S. 1357.

[2] Genauer: „Anfangskonzentration", da die Konzentrationen im Laufe des Versuches abnehmen

des Sauerstoffs sicher richtig. Denn wenn die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen mit und ohne Urethan verglichen wurde, so waren stets die Sauerstoff-Außenkonzentrationen zu Beginn des Versuches die gleichen. Bezuglich der anderen Komponente des Systems, der Oxalsäure, konnte man im Zweifel sein, ob man den in der Zelle gegebenen Verhaltnissen naher kommt, wenn man die Oxalsaurekonzentration oder die Oxalsauremenge konstant halt Ich habe Versuche angestellt

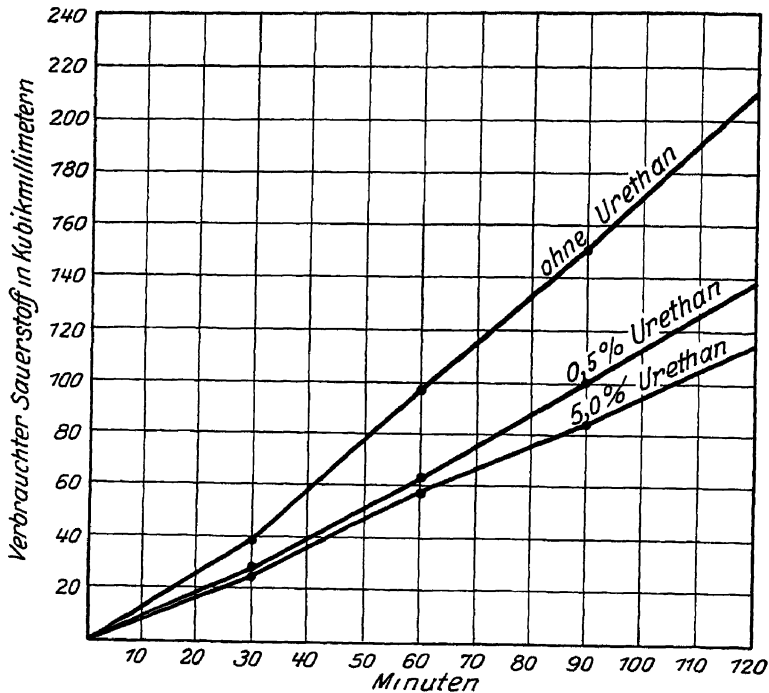



Abb 2 Hemmung durch Methylurethan. 38°

auch bei konstanter Oxalsauremenge; zu 1,5 ccm 6proz Kohlesuspensionen, die mit verschiedenen Urethankonzentrationen in Gleichgewicht gebracht waren, wurden gleiche Mengen Oxalsaure zugesetzt. Infolge von Adsorptionsverdrängung waren dann die Oxalsaurekonzentrationen in der Suspensionsflussigkeit verschieden Die Verhaltnisse werden jedoch bei einer solchen Anordnung etwas kompliziert, und ich beschränke mich deshalb auf Wiedergabe der Versuche mit konstanter Oxalsaurekonzentration

Der typische Verlauf eines derartigen Hemmungsversuches ist in der vorstehenden graphischen Darstellung dargestellt (Abb. 2). Wir

sehen zunächst wieder in der Kontrolle ohne Urethan, daß die Oxydationsgeschwindigkeit anfangs etwas zunimmt, auch bei 0,5% Urethan ist diese Zunahme deutlich, weniger bei 5% Urethan Die Folge davon ist, daß die Hemmungen bei höheren Urethankonzentrationen etwas progressiv sind, das heißt: die Hemmungen sind in den Anfangsperioden etwas kleiner als später Immerhin macht das nicht viel aus Um die durch die Progression bedingte Unregelmäßigkeit nach Möglichkeit auszuschalten, habe ich zum Vergleich die nach einer bestimmten Zeit beobachteten Hemmungen ausgerechnet und in der folgenden Zusammenstellung die Hemmungen nach 2stündiger Dauer des Versuches angegeben (ist ohne Urethan nach 2 Stunden die Sauerstoffmenge a verbraucht, bei Gegenwart von Urethan die Sauerstoffmenge b, so ist die Oxydationshemmung $\frac{a-b}{a}$ oder, in Prozenten ausgedrückt, $\frac{a-b}{a} \times 100$)

Tabelle 1. *Oxalsäure-Kohle.*

Substanz	Gewichtsprozente	Prozentische Oxydationshemmung $\left(\frac{a-b}{a} \times 100\right)$
Methylurethan	0,05	0
	0,5	34
	5,0	46
	10,0	60
Äthylurethan	0,5	42
	5,0	65
	10,0	76
Propylurethan	0,05	41
	0,5	72
	5,0	92
Phenylurethan	0,005	34
	0,05	90

Tabelle 2 *Rote Blutzellen*[1].

Substanz	Gewichtsprozente	Prozentische Oxydationshemmung $\left(\frac{a-b}{a} \times 100\right)$
Methylurethan	10	ca 60
Äthylurethan	1,25	14
	2,5	22
	5,0	88
Propylurethan	1,0	44
	2,0	94
Phenylurethan	0,025	33
	0,05	55
	0,1	90

Aus der Zusammenstellung geht unzweideutig hervor, daß Methylurethan schwächer wirkt als Äthylurethan dieses schwächer als Propylurethan, dieses schwächer als Phenylurethan Wir haben also dieselbe Reihenfolge der Wirkungsstärken, wie sie für die Oxydationshemmungen in lebenden Zellen gefunden wurden

Aus einem Vergleich der Tabelle 1 mit Tabelle 2 geht ferner hervor, daß die Konzentrationen, die eine bestimmte Oxydationshemmung in Zellen[2] bewirken, vielfach die Oxydationsgeschwindigkeit unseres

[1] Siehe O Warburg in Asher-Spiro l. c

[2] Die Konzentrationen für Blutzellen und andere Zellen sind nicht sehr verschieden. Vgl. O Warburg in Asher-Spiro: Ergebn. d. Physiol. l. c.

Modells um einen ähnlichen Betrag vermindern. Vielleicht ist diese Übereinstimmung mehr als ein Zufall, nicht durch die Wahl des Substrats, der Oxalsaure, und ihrer Konzentration bedingt Auch fur die Wirkung der Narkotica auf chemische Vorgange in Zellen wurde ja gezeigt, daß die besondere Natur der chemischen Reaktion auf die Wirkungsstärken nur von geringem Einfluß ist, beispielsweise wurden Oxydationsgeschwindigkeit und Garungsgeschwindigkeit in der Hefezelle durch sehr ahnliche Konzentrationen indifferenter Narkotica gehemmt[1]

Aus einem Vergleich der beiden Tabellen geht endlich hervor, daß die Wirkung der Narkotica auf das Modell sich in einem sehr wesentlichen Punkt von der Wirkung auf die Zelloxydationen unterscheidet Die Wirkung der Narkotica auf die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen wachst viel schneller mit der Konzentration als die Wirkung auf die Modelloxydationsgeschwindigkeit. Dieser Unterschied durfte damit zusammenhängen, daß einerseits die Adsorption der Narkotica an den gequollenen Gelen der Zelle nach einem anderen Gesetz verlauft als die Adsorption an der Kohleoberflache (die Adsorptionsisothermen sind weniger gekrummt[2]), daß anderseits bei der Narkoticawirkung in der Zelle nicht nur die Adsorption an den Gelen, sondern auch an den Ultramikronen der Sole eine Rolle spielt Das Modell ware ahnlicher, wenn wir die Oxalsaure an der Oberflache eines gequollenen Gels unter der Einwirkung eines im Solzustand befindlichen Katalysators verbrennen wurden

III. Bemerkung über den Mechanismus der Kohlekatalyse und über den Mechanismus der Hemmungen.

Daß die Verbrennung der Oxalsaure an der Kohleoberflache vor sich geht, dürfte kaum einem Zweifel unterliegen, wir haben es hier mit einem typischen Fall von Oberflachenkatalyse zu tun Wir wissen jedoch nicht, in welcher Weise die an der Kohleoberflache herrschenden Bedingungen die Oxydationsbeschleunigung herbeifuhren, und es sei daran erinnert, daß viele Stoffe, die sonst nicht bestandiger sind wie Oxalsaure, an der Kohle zwar verdichtet, aber nicht verbrannt werden So wird Zucker bekanntlich adsorbiert, aber nicht chemisch[3] verändert

Auf eine Tatsache mochte ich in diesem Zusammenhang hinweisen Die Blutkohle von Merck, die in meinen Versuchen verwendet wurde und die auch fruher, dank ihres starken Adsorptionsvermögens, vielfach zu Adsorptionsversuchen verwendet wurde, ist zwar mit Sauren

[1] Warburg, O., in Asher-Spiro l. c.

[2] Vgl. die Werte fur Thymol in Asher-Spiro l c.

[3] Rona u. Michaelis. Biochem. Zeitschr. **16**, 489 1909.

gereinigt, enthalt aber nichtsdestoweniger reichlich Mineralbestandteile[1], darunter auch Eisen. Man kann sich davon leicht uberzeugen, wenn man die Kohle an der Luft gluht. Es bleibt dann eine helle Asche, die starke Eisenreaktion gibt. Verascht man nicht, sondern kocht die Kohle mit Säure aus, so gehen nur Eisenspuren ins Filtrat

Blutkohle ist also keineswegs reiner Kohlenstoff, sondern eine Kombination von Kohlenstoff mit Mineralbestandteilen. Gerade der Gehalt an Eisen ist, im Zusammenhang mit den oxydationsbeschleunigenden Eigenschaften der Kohle, jedenfalls beachtenswert

Was den Mechanismus der Hemmungen anbetrifft, so ist das nachstliegende, an eine Verdrangung der Oxalsaure von der Kohleoberfläche zu denken; in der Tat wird aus einem Gemisch zweier adsorbierbarer Substanzen jede Komponente stets schwacher adsorbiert als aus reiner Losung[2]. Starker adsorbierbare Substanzen wirken stärker verdrangend[2], die Reihenfolge der Wirkungsstarken am Modell ware dann so zu erklaren, daß um so mehr Oxalsaure von der Oberfläche verdrängt wird, je capillaraktiver das betreffende Narkoticum ist.

Soll auch nicht in Abrede gestellt werden, daß die Adsorptionsverdrangung als ursachliches Moment der Hemmungswirkungen in Betracht kommt, so halte ich es doch fur sehr fraglich, ob sie allein in Betracht kommt Ich vermute vielmehr, daß auch Veranderungen des Milieus an der Kohleoberflache, die nicht auf Adsorptionsverdrangung beruhen, eine wesentliche Rolle spielen Ist diese Hypothese richtig, so ware zu erwarten, daß ein Narkoticum auf die verschiedensten Oberflachenkatalysen, bei ganz verschiedenen Substraten, ahnlich wirkt.

IV. Gasanalytische Methodik.

Sauerstoffverbrauch und Kohlensaureproduktion wurden nach einer von SIEBECK und dem Verfasser ausgearbeiteten Methode gemessen Die Methode ist von SIEBECK in ABDERHALDENS Biochemischen Arbeitsmethoden[3] genauer beschrieben, und so kann ich mich hier mit einigen kurzen Bemerkungen begnugen Das Volumen der Schuttelgefaße, in denen die Druckverminderungen auftraten, betrug etwa 11 ccm (nach Einfullen der 1,5 ccm Kohlesuspension und der zur Absorption der Kohlensaure dienenden Kalilauge) Ein Ausschlag am Manometer um 1 mm entsprach unter diesen Bedingungen ungefahr einem Sauerstoffverbrauch von 1 cmm Da der Fehler nicht mehr als 2 mm betragt, so sind also die Angaben genau auf 2 im Verhaltnis zur Zahl der verbrauchten Kubikmillimeter

---

[1] Aschebestimmungen bei GLASSNER u SUIDA Liebigs Ann d Chem **357**, 95 1907

[2] MICHAELIS u RONA Biochem. Zeitschr **15**, 209 1908 — FREUNDLICH u. MASIUS in FREUNDLICH. Capillarchemie S 163. Leipzig 1909.

[3] Der betreffende Band befindet sich im Druck.

Sollten Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion gemessen werden, so wurden in zwei Schüttelgefäße je 1,5 ccm der gleichen Kohlesuspension eingefüllt. In ein Schüttelgefäß wurde, wie gewöhnlich, in den Einsatz Kalilauge gegeben, in das andere wurde keine Kalilauge gegeben. In dem einen Schüttelgefäß tritt dann ein positiver, in dem anderen ein negativer Druck auf. Der negative Druck entspricht dem Sauerstoffverbrauch, der positive, vermehrt um den in dem anderen Gläschen auftretenden negativen, der an den Gasraum abgegebenen Kohlensäure. Zu der an den Gasraum abgegebenen Kohlensäure ist die in der Flüssigkeit gelöste Kohlensäure zu addieren; dieses Korrektionsglied ergibt sich aus dem Partialdruck der Kohlensäure in dem Gefäß, der Flüssigkeitsmenge und dem Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure bei der Versuchstemperatur. Die Adsorption der Kohlensäure an der Kohle ist ein Korrektionsglied, das nicht berechnet werden konnte. Diese Adsorption wird dahin wirken, daß der Wert für die Kohlensäure etwas zu klein ausfällt.

Hoppe-Seylers Zeitschr f. physiol. Chem. 92, 231 1914

Über die Rolle des Eisens in der Atmung des Seeigeleis nebst Bemerkungen über einige durch Eisen beschleunigte Oxydationen[1].

Von

Otto Warburg.

(Mitglied des Kaiser Wilhelm-Instituts fur Biologie.)

(Aus der zoologischen Station in Neapel)

(Eingegangen am 1. Juni 1914)

Mit 7 Abbildungen.

Vor kurzem wurde gezeigt[2], daß die Zellstruktur des unbefruchteten Seeigeleis weitgehend zerstort werden kann, ohne daß Sauerstoffverbrauch und Kohlensaureproduktion verlangsamt werden Das unbefruchtete Seeigelei ist also — im Gegensatz zu vielen anderen Zellen — eine Maschine, in der die Geschwindigkeit der arbeitliefernden chemischen Reaktion von der Struktur der Maschine weitgehend unabhangig ist

Erst durch diesen Befund war die Moglichkeit gegeben. mit der Eiatmung, wie mit einer chemischen Reaktion, im Reagensglas zu experimentieren Die Versuche — im ganzen mehrere 1000 Messungen — fuhrten mit uberwiegender Wahrscheinlichkeit zu der Annahme, daß eine einfache und bekannte chemische Reaktion der erste Schritt im Mechanismus der Sauerstoffatmung ist

Als Material dienten ausschließlich die Eier von Strongylocentratus lividus

Gasanalytische Methodik

Die Sauerstoffaufnahme wurde nach der mehrfach beschriebenen manometrischen Methode unter Benutzung der BARCROFT-HALDANEschen Blutgasmanometer gemessen

Die Volumina, in denen die Druckverminderungen entstanden, betrugen ca 11 ccm so daß 1 mm Ausschlag am Wassermanometer einem Sauerstoffverbrauch von 1 cmm entsprach

Was die Kohlensaurebestimmungen anbetrifft, so wurden einige nach der fruher[3] angegebenen Modifikation des PETTENKOFERschen

---

[1] Die Kosten dieser Untersuchung wurden zum Teil durch Forschungsbeihilfen der Heidelberger Akademie der Wissenschaften und der Jagor-Stiftung gedeckt.

[2] Pflugers Arch f. d. ges. Physiol. 158, 189. 1914.

[3] Hoppe-Seylers Zeitschr. f physiol. Chem 88, 425 1913.

Barytverfahrens ausgefuhrt Diese Methode ist von allen wohl die sicherste, sie ist jedoch nicht nur umstandlich, sondern erfordert auch Eimengen, wie sie nur selten beschafft werden konnen. Ich habe deshalb, in Anlehnung an die Haldane-Barcroftsche Methode der CO_2-Bestimmung im Blut, ein Verfahren eingeschlagen, das CO_2-Bestimmungen mit sehr kleinen Substanzmengen ermöglicht

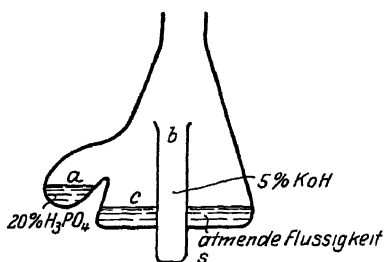



Abb 1

In 3 Gefaße (Nr 1, 2 u 3) von der in Abb 1 abgebildeten Form und von je 15 ccm Rauminhalt wurden je 1,5 ccm des atmenden Materials gegeben und zwar in den Raum *c* der Abbildung Der Anhang *a* des Glaschens Nr. 1 blieb leer, wahrend in den Einsatz *b* 5proz Kalilauge, zur Absorption der Kohlensaure, eingefullt wurde Die Anhange *a* der Glaschen Nr 2 und 3 wurden mit je 0,5 ccm 20proz wasseriger Phosphorsaure beschickt, wahrend ihre Einsatze *b* leer blieben Darauf wurde jedes Glaschen mit einem Manometer verbunden, in den Thermostaten eingehangt und 10 Min lang bei offenem Hahn zwecks Temperaturausgleich durch Anstoß an einen bei *s* befestigten Gummischlauch geschuttelt Dann, nach Schluß der Hahne, wurde sofort in Glaschen Nr 3 die Phosphorsaure aus dem Anhang *a* in *c* umgekippt, wobei ein beim Schutteln bald konstant werdender positiver Druck entstand Aus der Große dieses Drucks ergibt sich die „praformierte Kohlensaure" Glaschen Nr 1 und 2 werden durch Anstoß an den Gummischlauch weiter geschuttelt, wobei in Nr 1 ein dem Sauerstoffverbrauch entsprechender negativer Druck auftritt, wahrend in Nr 2, nach Maßgabe der in den Gasraum ubergehenden Kohlensauremengen, ein geringerer negativer Druck (oder kein negativer Druck) auftritt Durch Vergleich der Druckanderungen in Nr 1 und Nr. 2 erhalt man direkt die CO_2-Ausscheidung in den Gasraum, sei der negative Druck in Nr. 1 30 mm, der negative Druck in Nr 2 nach der gleichen Zeit 2 mm, so ist in den Gasraum entsprechend dem Druck $30 - 2 = 28$ mm CO_2 abgegeben worden Hierzu kommt eine kleine Korrektion, wenn man bedenkt, daß in dem Gefaß sich ca 2 ccm Flüssigkeit befinden, die merkliche Mengen CO_2

losen; fur eine Salzlosung, wie Seewasser, und 23° wird diese Korrektion so berechnet, daß man fur den Teilungskoeffizienten der CO_2 zwischen Salzlosung und Gasraum die Zahl 0,7 annimmt[1] (Haben wir beispielsweise 2 ccm Salzlösung und 14 ccm Gasraum, so ist in der Salzlosung nach eingetretenem Gleichgewicht $^1/_7$ mal 0,7 = 0,1 mal soviel CO_2, als im Gasraum.)

Kann man nun auch die CO_2-Abgabe durch Vergleich der in Nr 1 und Nr. 2 auftretenden Druckänderungen sehr einfach messen, so ist die CO_2-Produktion auf diese Weise nicht zu ermitteln, vor allem, weil man nicht weiß, wieviel von der an den Gasraum abgegebenen CO_2 praformierte CO_2 ist Um diese Unsicherheit auszuschalten, kippt man nach Beendigung des Versuchs und nachdem man die Druckanderung in Nr. 1 abgelesen hat, die Phosphorsaure aus dem Anhang *a* des Glaschens Nr. 2 in *c* um Es stellt sich bald ein konstanter Druck ein, der abgelesen wird Nehmen wir an, wir hatten

in Nr. 1	abgelesen	— 20 mm
in Nr 2	„	— 2 „
in Nr. 3	„	+ 3 „

und die Gasraume waren gleich, so ware CO_2 neugebildet entsprechend dem Druck

(20 — 2)	minus	3
(= nach Atmung und Ansauern an den Gasraum abgegebene CO_2.)		(= ohne Atmung nach Ansauern an den Gasraum abgegebene CO_2)

Dazu kommt dann eine kleine Korrektion wegen der in der Salzlosung gelosten CO_2

Die Methode lauft also hinaus auf 3 Druckablesungen Voraussetzung ist, daß kein anderes, durch KOH absorbierbares Gas entsteht Man konnte hier an H_2S als Fehlerquelle denken ein Gas das nach der Strukturzerstorung in der Eisubstanz vorhanden ist[2] Die Mengen an H_2S jedoch sind so gering, daß sie keinen Fehler verursachen Man kann das erstens so nachweisen daß man in den Einsatz *b* eines Glaschens saure $CuSO_4$-Losung bringt, die den H_2S absorbiert zweitens so, daß man die Methode durch die Barytmethode mit vorgeschalteter $CuSO_4$-Losung kontrolliert, man findet dann, daß Druckmethode und Barytmethode ubereinstimmende Resultate geben

Die Druckmethode ist in dem unten mitgeteilten Beispiel zur Entscheidung der Frage benutzt, ob sich mehr CO_2 bildet bei Gegenwart

[1] Uber die Loslichkeit der CO_2 in Salzlosungen siehe Fox Publications de Circonstance Nr. 44 Kopenhagen 1909. Der Absorptionskoeffizient der Kohlensaure in einer 3,5 proz NaCl-Losung ist um ca 12% kleiner, als in Wasser, unter sonst gleichen Bedingungen.

[2] Siehe Pflugers Arch. f. d ges. Physiol. l. c.

von Fe 4 Glaschen von der in Abb 1 wiedergegebenen Form wurden folgendermaßen beschickt:

Nr. 1	mit	1,5 ccm	Material		in *c*,	KOH	in	*b*
Nr. 2	„	1,5 „	„		;	H_3PO_4	„	*a*
Nr. 3	„	1,5 „	„	+ Fe	„ *c*,	KOH	„	*b*
Nr 4	„	1,5 „	„	+ Fe	„ *c*,	H_3PO_4	„	*a*

Nach einer passenden Zeit wurden die Druckverminderungen in Nr 1 und Nr. 3 abgelesen, dann sofort die in Nr 2 und Nr 4, die Anhange *a* umgekippt, und nach eingetretener Druckkonstanz die Drucke in Nr 2 und Nr. 4 notiert. Man erhalt so die unter Fe-Einfluß mehrproduzierte CO_2

Schließlich sei, wie schon fruher, auch hier nochmals darauf hingewiesen, daß fur alle CO_2-Bestimmungen das Material durch Waschen mit einer bicarbonatfreien Flussigkeit von Seewasser befreit sein muß

I. Der Eisengehalt der Eier

ist so gering, daß bei den zur Verfugung stehenden Materialmengen für die Bestimmung nur colorimetrische Methoden in Betracht kommen Von diesen erwies sich als sehr brauchbar und bequem die Methode nach Lachs und Friedenthal[1] Im einzelnen verfuhr ich folgendermaßen

Die Eier von reifen Strongylocentraten wurden mit Seewasser gewaschen und dann mit CO_2-haltigem Seewasser von ihren Gallerthullen befreit[2], so daß beim Zentrifugieren ein ganz dichtes Eisediment erhalten wurde 10 ccm Sediment wurden in eine flache Porzellanschale gebracht, zur Trockne verdampft und durch Erhitzen verascht Die Kohle wurde heiß mit Salzsaure extrahiert, getrocknet, wieder gegluht und ein zweites Mal mit Salzsaure extrahiert Dann wurden die vereinigten salzsauren Auszuge, nach Zugabe eines Kornchens $KClO_3$ zur Überfuhrung des Eisens in die Oxydform, zur Trockne gedampft Der durch $FeCl_3$ schwach gelblich gefarbte Ruckstand wurde in wenigen Kubikzentimetern Wasser und einem Tropfen verdünnter Salzsaure aufgenommen und mit Wasser auf ein Volumen von 3 ccm gebracht, davon wurden 1 ccm in ein Reagensglas gegeben und 1 ccm 6-n-HCl, 1 ccm 10% KCNS und 1 ccm Äther zugefugt

Beim Schutteln farbte sich der Äther rot Seine Farbung wurde mit einer Serie von Farbungen verglichen, die durch Vermischen um je 1 ccm abgestuft verdünnter Freseniusscher Eisenchloridlosung[3]

---

[1] Biochem. Zeitschr 32, 130 1911; ein Vorteil dieser Methode ist unter anderem, daß kleine Mengen H_3PO_4 die Farbung im Äther nicht beeinflussen

[2] Siehe Pflugers Arch. f d ges Physiol. 158. 1914.

[3] Die Stammlosung enthalt 10 mg Fe in 1 ccm Sie kann von Kahlbaum bezogen werden.

mit 1 ccm 6-n-HCl, 1 ccm 10% KCNS und 1 ccm Äther entstanden waren Die unbekannte Eisenkonzentration ließ sich so mit einem Fehler von etwa 30% ablesen

Um definierte Beziehungen zu erhalten, wurde stets in einem aliquoten Teil des Eisediments, dessen Fe-Gehalt gemessen werden sollte, der Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt. 1 ccm enthielt im Mittel ca 20 mg, also 10 ccm, die zur Bestimmung verwandte Menge, ca 200 mg N

In einer großeren Reihe von Versuchen ergab sich, daß in der Substanz der reinen Eier auf 100 mg N 0,02 bis 0,03 mg Eisen kommen (also auf 1 g Trockensubstanz einige Hundertstelmilligramme Eisen).

Dreierlei Kontrollen wurden angestellt Die erste betraf den Eisengehalt der Reagenzien Die verwendete Salzsaure stammte von KAHLBAUM und wurde als „eisenfrei“ in einer Porzellanflasche geliefert ($d = 1{,}19$) Eine Probe der Saure wurde durch Verdunnung 6fach normal gemacht, dann 1 ccm 10% KCNS, 1 ccm destilliertes Wasser und 1 ccm Äther zugefugt Es trat keine Spur von Rosafarbung auf Ferner wurden 30 ccm der konzentrierten Salzsaure, 60 ccm destilliertes Wasser und ein Krystall $KClO_3$ im Wasserbad zur Trockne verdampft und auf 3 ccm gebracht, davon wurde 1 ccm, wie im Versuch, mit HCl, KCNS und Ather vermischt, wobei eine leichte Rosafarbung auftrat, an Intensitat nicht in Betracht kommend gegenuber der in der Versuchsflussigkeit auftretenden Rotfarbung Die Substanzmengen die zu dieser Kontrolle verwendet waren betrugen etwa das Doppelte von denjenigen Mengen an Wasser HCl und $KClO_3$ die fur die Fe-Bestimmungen verwendet worden waren — Die zweite Kontrolle betraf den Eisengehalt des Seewassers Wie erwahnt wurden 10 ccm Sediment zur Eisenbestimmung verwendet Diese enthielten schatzungsweise als Zwischenflussigkeit 1 ccm Seewasser wurden nun 10 ccm Seewasser wie die Eisubstanz behandelt so konnte nur eine Spur Rosafarbung wahrgenommen werden nicht in Betracht kommend gegen die Rotfarbung bei der Bestimmung — Die dritte Kontrolle sollte entscheiden ob die Eier das Eisen schon in den Ovarien enthalten, oder ob sie es erst außerhalb der Ovarien aus dem Seewasser — sie wurden ja mit großen Mengen Seewasser gewaschen — aufnehmen Es wurden deshalb reife Ovarien moglichst sauber prapariert, mit destilliertem Wasser abgespult und wie die Eier verascht Es ergab sich ein Eisengehalt von 0,015 mg 100 mg N, d i dieselbe Großenordnung, aber vielleicht etwas weniger als in den Eiern Entweder also nehmen die Eier noch ein wenig Eisen beim Waschen mit Seewasser auf, oder aber — das ist die wahrscheinlichere Erklarung — die Eier enthalten mehr Eisen als das Ovarialgewebe

Was die Form anbetrifft, in der das Eisen in der Eisubstanz vorkommt, so ist folgender Versuch wichtig fällt man die Eier mit Aceton und wäscht sie mit Äther (wobei sich die Oxydationsgeschwindigkeit einer gegebenen Menge für die erste Zeit nur wenig ändert, während die Kohlensäureproduktion aufhört), so erhält man ein weißliches Pulver[1], übergießt man dieses Pulver mit Rhodankali und dann mit einem Tropfen Salzsäure, so tritt eine rötliche Färbung, offenbar die des Rhodaneisens, auf Das Eisen oder ein Teil des Eisens liegt also, nach Zugabe von HCl, als Ion vor

II. Wirkung von zugesetztem Eisensalz auf die Oxydationsgeschwindigkeit.

Die folgenden Versuche wurden mit der Granulasuspension angestellt, deren Gewinnung aus intakten unbefruchteten Eiern früher ausführlich beschrieben wurde[2] Sie ist eine in dünnen Schichten durchscheinende rötliche Flüssigkeit, ziemlich zäh, aber doch so flüssig, daß sie sich gut mit der Pipette abmessen läßt

Die Atmung dieser Flüssigkeit ist nun keineswegs in ihrer Größe so leicht und auf so mannigfache Art beeinflußbar, wie die Atmung der intakten Eier Ich kenne nur wenige Stoffarten, die bei Zusatz zu der Granulasuspension oxydationsbeschleunigend wirken, zu ihnen gehört Eisensalz, das in sehr kleinen Mengen wirkt, sowohl in der Oxydul- als auch in der Oxydform Durch andere Metallsalze wurde bisher eine Beschleunigung nicht erzielt

a) Das Eisenoxydulsalz, mit dem die meisten Versuche angestellt wurden, wurde in Form einer wässerigen Lösung des Mohrschen Salzes ($(NH_4)_2 SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6 H_2O$) zugesetzt, um stärkere Verdünnungen der Granulasuspensionen zu vermeiden, waren die Konzentrationen der Eisenlösungen stets so bemessen, daß auf 1 ccm Granulasuspension 0,1 ccm Eisensalz gegeben wurde

In Hunderten von Versuchen ergab sich, daß Zusatz von 0,01 bis 0,02 mg Fe zu 1,5 ccm Granulasuspension (= 22 mg N), bei 23°, die Oxydationsgeschwindigkeit um 50—110% steigert Als typisches Beispiel für den Verlauf einer Fe-Beschleunigung soll die graphische Darstellung in Abb 2 dienen

In diesem Beispiel haben wir nach 60 Min. und bei 23° durch 0,008 mg

---

[1] Das Pulver aus unbefruchteten Eiern ist heller, als das aus befruchteten Eiern. Die letzteren geben ihren Farbstoff an Aceton und Äther viel langsamer ab. Es erinnert das an eine Beobachtung von J. Loeb, nach der mit Neutralrot gefärbte Seeigeleier diesen Farbstoff nach der Befruchtung viel langsamer abgeben, als vor der Befruchtung. Biochem. Zeitschr. 2, 34 1906.

[2] Pflügers Arch f. d ges Physiol. 158, 189. 1914.

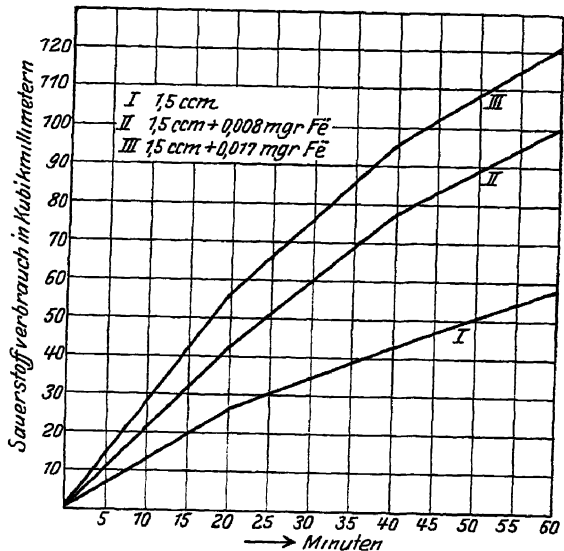
Fe eine Beschleunigung von 72% und durch 0,017 mg Fe eine Beschleunigung von 109%

Die Wirkung des Eisens wächst nicht proportional der zugesetzten Menge, sondern langsamer. Zusatz von erheblich mehr als 0,02 mg Fe zu 20mg Ei-N hat keinen erheblich größeren Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit, Zusatz von erheblich weniger Fe˙ als 0,005 mg hat keinen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit

Abb 2

Es ist im höchsten Grade bemerkenswert, daß die Oxydationsgeschwindigkeit auf Zusatz von grade solchen Eisenmengen reagiert, wie sie, der Größenordnung nach, in der Eisubstanz natürlich vorkommen Auf 100mg Ei-Stickstoff kommen, wie wir in I erfuhren, 0,02 bis 0,03 mg Fe Setzt man zu 100 mg Ei-Stickstoff Hundertstel-Milligramme Fe so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit sehr erheblich

b) Die Atmung der Granulasuspension nimmt im Laufe von Stunden ab und wird allmählich sehr klein[1] Sie nimmt schneller ab wenn man zur Herstellung der Suspension eine etwas verdünntere Eisuspension benutzt

Es ist nun für den Erfolg des Eisenzusatzes keineswegs gleichgültig ob das Eisen bald oder erst längere Zeit nach der Strukturzerstörung zugesetzt wird Die Eisenwirkungen von denen in a) die Rede war, treten nur dann auf wenn das Eisen zur Zeit der ungeschwächten Atmung zugesetzt wird Wie aus Abb 2 hervorgeht, beträgt das Plus an O_2-Aufnahme in 60 Min dann etwa 60 cmm Sauerstoff, bei einem Eisenzusatz von 0,017 mg auf 22 mg Ei-Stickstoff Setzt man dagegen das Fe-Salz nach 4—5 Stunden zu, wenn der Sauerstoffverbrauch schon sehr klein geworden ist, so ist der Erfolg ein viel geringerer, das Plus an Sauerstoffaufnahme beträgt dann unter sonst gleichen Bedingungen nur etwa

[1] Pflügers Arch f d ges Physiol l c

16 cmm Sauerstoff. Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, daß das zugesetzte Eisensalz den Sauerstoff auf eine im Atmungsprozeß verschwindende Substanz ubertragt

III. Bildet sich bei Eisenzusatz mehr Kohlensäure?

Wie früher mitgeteilt[1], laßt die Kohlensaureproduktion in der Granulasuspension schneller nach als die Sauerstoffaufnahme, die Atmung geht also allmahlich und spontan in eine Sauerstoffzehrung uber

Dieses Phanomen scheint nun auch das Plus an Sauerstoffaufnahme, das sich bei Eisenzusatz einstellt, zu zeigen, nur in noch viel hoherem Maße. Denn kurze Zeit nach dem Eisenzusatz wird in der Regel mehr Kohlensäure produziert als ohne Eisenzusatz, wobei die Mehrproduktion an Kohlensaure im Verhaltnis zur Mehraufnahme des Sauerstoffs ohne erkennbaren Grund recht wechselnd ist. Zweimal habe ich für das bei Eisenzusatz einsetzende „Plus" einen Quotienten $\frac{CO_2}{O_2}$ von nahezu 1 gemessen, ofters einen Quotienten von 0,5, in 2 Versuchen war die Kohlensäureproduktion nicht vermehrt

Die Messungen nach der manometrischen Methode konnen erst 10 Min nach Zusammengeben und Einfullen des atmenden Materials beginnen, weil erst dann Temperaturausgleich eingetreten ist Diese ersten 10 Min gehen also fur die Messung stets verloren

Schließt man nach 10 Min die Hahne und beobachtet die Druckanderungen, so sieht man, daß stets 10—15 Min nach Beginn der Messung, also 20—25 Min nach Zusatz des Eisens, die Mehrproduktion an CO_2 sehr schnell nachlaßt Der Versuch darf also nicht langer dauern als 10—15 Min, von dem Augenblick des Hahnschlusses an gerechnet

Als Beispiel fuhre ich einen Versuch in extenso an, in dem der Quotient fur den bei Eisenzusatz einsetzenden Mehrverbrauch an Sauerstoff etwa 0,5 war (Methodik siehe Anfang dieser Abhandlung).

Temperatur 20° In 4 Glaschen von der Form der Abb 1 je 1,5 ccm Granulasuspension Dauer 13 Minuten

1 Ohne Fe-Zusatz, im Einsatz KOH Verschwunden 28 cmm Gas, also Sauerstoffverbrauch 28 cmm

2 Mit 0,043 mg Fe; im Einsatz KOH Verschwunden 41 cmm Gas, also Sauerstoffverbrauch 41 cmm

1a) Ohne Fe-Zusatz, im Einsatz keine KOH, im Anhang *a* 0,5 ccm 20% H_3PO_4 Nach 13 Min umgekippt 10 cmm Gas waren hinzugekommen

---

[1] Pflugers Arch f d ges Physiol l. c

1b) Mit 0,043 mg Fe˙, im Einsatz keine KOH, im Anhang *a* 0,5 ccm 20% H_3PO_4 Nach 13 Min umgekippt 4 cmm Gas waren entwickelt

Also, abgesehen von der Korrektion, die hier praktisch nichts ausmacht

Mehrverbrauch an Sauerstoff bei Zugabe von 0,043 mg Fe 41 — 28 = 13 cmm

Mehrproduktion von Kohlensäure bei Zugabe von 0,043 mg Fe˙: (41 + 4) — (28 + 10) = 7 cmm.

Quotient für das Plus: $\frac{7}{13}$ = ca. 0,5.

IV. Das Verhalten der durch Eisenzusatz beschleunigten Oxydation gegenüber Äthylurethan.

Wenn dem Mehrverbrauch an Sauerstoff, der nach Eisenzusatz beobachtet wird, dieselben chemischen Prozesse zugrunde liegen wie der Atmung, so ist zu erwarten, daß sich der Mehrverbrauch auch in ähnlicher Weise beeinflussen läßt wie die Atmung Von diesem Gesichtspunkt aus war es interessant, die Wirkung eines Narkoticums auf den Mehrverbrauch zu untersuchen Es hat sich dabei gezeigt, daß Äthylurethan den Mehrverbrauch um fast den gleichen Betrag hemmt wie die Atmung

Unter „Prozenten“ Urethan verstehen wir diejenige Menge in Grammen, die 100 g Granulasuspension zugesetzt wurde Die Atmung der Granulasuspension ohne Fe-Zusatz, wurde gehemmt

durch 4,6% Äthylurethan um 36%,
durch 8,3% „ „ 78%.

Wurden zu 1,5 ccm Granulasuspension je 0,04 mg Fe gegeben so wurde der Sauerstoffverbrauch gehemmt

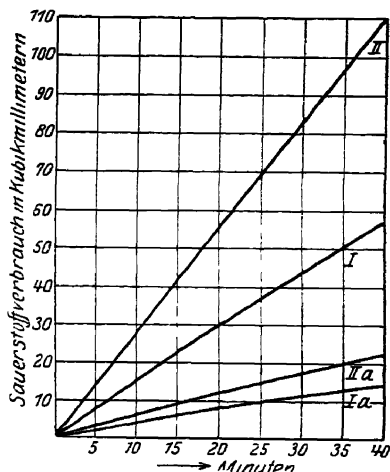
durch 4,6% Äthylurethan um 32%,
durch 8,3% „ „ 78%.

I 1,5 ccm Ia 1,5 ccm, 8,3% Urethan
II 1,5 ccm + 0,04 mg Fe.
IIa 1,5 ccm + 0,04 mg Fe 8,3% Urethan

Abb 3

Das heißt also, die Wirkungen des Urethans auf Atmung und auf gesteigerte Atmung sind so gut wie identisch.

Ein weiterer Versuch ist in Abb. 3 graphisch dargestellt:

Die Hemmungen durch 8,3% Urethan betragen
in der Granulasuspension 75%,
in der mit Fe versetzten Granulasuspension 80%,
stimmen also wiederum fast überein.

Anhangsweise sei darauf aufmerksam gemacht, daß, wie aus Abb. 3 hervorgeht, die Hemmungen sich innerhalb 40 Min. mit der Zeit nicht ändern.

V. Über einige durch Eisen beschleunigte Oxydationen.

In diesem Abschnitt sollen einige Fe-Oxydationskatalysen besprochen werden, die zunächst als Modelle für die Wirkung des Eisens auf die Eisubstanz von Interesse sind; vielleicht wird sich später herausstellen, daß eins dieser Modelle — das System Linolensäure-Eisensalz — im natürlichen Atmungsmechanismus eine Rolle spielt.

Geht man lediglich darauf aus, Systeme zusammenzustellen, in denen Fe in irgendeiner Weise als Oxydationskatalysator wirkt, so ist die Auswahl eine sehr große. Die Auswahl wird jedoch sehr viel kleiner, wenn man den oben beschriebenen Experimentalfall soweit nachahmen will, daß folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. daß die Oxydation solcher Verbindungen beschleunigt wird, die den Zell-Brennstoffen chemisch nahe stehen,

2. daß der Sauerstoff, der von dem Eisen übertragen wird, an dieses in Form von O_2, nicht als H_2O_2, $KMnO_4$ usw. herantritt,

3. daß die Oxydation auch im Dunkeln erfolgt. (Die atmenden Zellen der höheren Tiere liegen größtenteils vor Licht geschützt, und Oxydationswirkungen, die durch Sauerstoffgas + Eisensalz erst bei Belichtung eintreten, können dem Atmungsmechanismus nicht wohl zugrunde liegen.)

4. daß die Geschwindigkeit der Oxydation unterhalb 40°, der Größenordnung nach, der in der Eisubstanz ähnlich ist.

Zunächst seien einige organische Stoffe angeführt, die auch bei Gegenwart von Eisensalz sich nicht mit merklicher Geschwindigkeit oxydieren:

Ölsäure, Kroton-, Ricinol-, Fumar-, Malein-, Eruca-, Aconit-, Citracon-, Elaidin-, Undecylen-, Tiglin-, Stearol-, Tartron-, Glucon-, Benztrauben-, Nuclein-, Glycerinphosphor-Säure; Guanin, Adenin, Histon, Eiweiß.

Dagegen beschleunigt Eisensalz, bei Zimmertemperatur, beispielsweise die Oxydation folgender Körper sehr erheblich: Weinsäure, Dihydroxymaleinsäure, Lecithin, Linolensäure, Cystein u. a. Thioverbindungen, Aldehyde. Von diesen Substanzen ist Weinsäure die einzige, die ohne Eisen bei Zimmertemperatur von Sauerstoffgas prak-

tisch nicht angegriffen wird, die ubrigen Substanzen oxydieren sich an der Luft „spontan“ schon mit merklicher Geschwindigkeit, wenn auch viel langsamer, als bei Gegenwart von Eisensalz. Einige dieser Eisen-Oxydationskatalysen sollen im folgenden kurz besprochen werden

1. Lecithin

a) Wie mir die Lecithinchemiker versichern, ist ihnen seit langer Zeit bekannt, daß Lecithin, wenn es unversehrt erhalten werden soll, vor Berührung mit Eisen zu schützen ist Doch ist es THUNBERGS Verdienst[1], die Oxydationsbeschleunigung des Lecithins durch Fe-Salz zuerst untersucht und ihre Größe gemessen zu haben

Die Angaben von THUNBERG konnte ich bestatigen, sowohl zweiwertiges als auch dreiwertiges Eisenion beschleunigt die Oxydation wasseriger Lecithinemulsionen sehr erheblich. Zum Studium der Reaktion benutzte ich sowohl kaufliches Lecithin (MERCK) als auch ein Praparat, das ich aus Huhnereiern selbst hergestellt hatte Ein Unterschied im Verhalten der Praparate wurde nicht beobachtet Die Lecithinemulsionen wurden durch Eingießen methylalkoholischer Losungen in Wasser hergestellt; man erhalt so, wie zuerst PORGES und NEUBAUER[2] angegeben haben feine und dauerhafte Emulsionen

Gibt man zu einer bestimmten Eisenmenge wachsende Mengen Lecithin so findet man, von einer gewissen Grenze an, daß die Oxydationsgeschwindigkeit langsamer wachst, als die in der Raumeinheit befindliche Lecithinmenge Will man also mit einer bestimmten Lecithinmenge moglichst große Oxydationsgeschwindigkeiten erzielen, so muß man relativ viel Katalysator zusetzen Folgende Mengenverhaltnisse sind zum Studium der Katalyse zu empfehlen 0 2 g Lecithin in 5 ccm Methylalkohol gelost werden in 200 ccm Wasser eingegossen Zu 2 ccm der Emulsion gibt man dann 0 2 ccm $^{n}/_{10}$-Essigsaure und 0 1 ccm einer 0 8proz Losung von MOHRschem Salz (= 0 1 mg Fe) Nach 8stundigem Schutteln bei 16° ist die Sauerstoffaufnahme praktisch zu Ende d h es wird weiterhin nur noch sehr wenig Sauerstoff aufgenommen

Um die Große der Beschleunigung zu bestimmen pipettiert man je 2 ccm der Emulsion in ein Atmungsglaschen fugt zu beiden Proben 0.2 ccm $^{n}/_{10}$-Essigsaure in eines außerdem 0 1 mg Fe und schuttelt nun beide im Thermostaten unter Beobachtung der Druckanderungen Nach 6—8 Stunden bei 16° hat die Kontrolle weniger als 1 cmm Sauerstoff verbraucht wahrend die Probe mit Eisen 90—95 cmm Sauerstoff aufgenommen hat

b) Schwaches, diffuses Tageslicht, wie es bei den meisten Versuchen in den Wasserthermostaten fiel, hatte auf die Geschwindigkeit

---

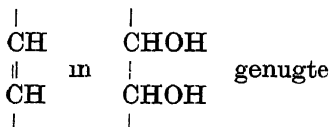
[1] THUNBERG, T Skandinav. Arch. f. Physiol. 24, 90. 1910

[2] Biochem. Zeitschr 7, 152. 1906.

der Katalyse keinen Einfluß. Denn die Reaktion verlief nicht langsamer im verdunkelten Zimmer.

c) Bei der Reaktion bildet sich keine Kohlensaure

d) Wie die spontane Oxydation des Lecithins ist auch die durch Eisen beschleunigte von einer Abnahme des Jodbindungsvermogens begleitet; und zwar wird ein Mehrfaches derjenigen Sauerstoffmenge aufgenommen, die zur Überfuhrung der verschwundenen Doppelbindungen

$$\begin{array}{c} | \\ CH \\ \| \\ CH \\ | \end{array} \quad \text{in} \quad \begin{array}{c} | \\ CHOH \\ | \\ CHOH \\ | \end{array} \quad \text{genugte}$$

e) Von den Beeinflussungen der Oxydationsgeschwindigkeit ist wichtig, daß Säuren — Essigsaure, Buttersaure, Salzsaure, Phosphorsaure, Schwefelsaure — sehr erheblich beschleunigend wirken (Deshalb wurde in der oben gegebenen Vorschrift nicht Wasser, sondern $^{n}/_{100}$-Essigsaure als Milieu empfohlen)

2 Linolensaure ($C_{18}H_{30}O_2$, Fettsaure mit drei Doppelbindungen, Molekulargewicht 278) ist von den Spaltungsprodukten des Lecithins das einzige, dessen Oxydation durch Eisensalz beschleunigt wird, hochstwahrscheinlich setzt demnach die Lecithinoxydation an der Linolensaurekomponente ein

a) Was die Mengenverhaltnisse anbetrifft, in denen zweckmaßigerweise Saure, Eisen und Wasser zum Nachweis der Katalyse gemischt werden, so gilt dasselbe, was fur das System Fe-Lecithin gesagt wurde wenig Substrat und viel Katalysator

Wie das Lecithin, bildet auch die Linolensaure feine und dauerhafte Emulsionen, wenn ihre methylalkoholische Losung in Wasser eingegossen wird Es wurden also 0,1 ccm Saure, in 5 ccm Methylalkohol gelost, in 200 ccm Wasser gegossen In 2 ccm der Emulsion waren dann 0,9 mg Linolensäure Je 2 ccm wurden in ein Atmungsglaschen pipettiert, in eins außerdem 0,1 ccm 0,8proz Losung von Mohrschem Salz (= 0,1 mg $Fe^{\cdot\cdot}$). Bei 16° wurden dann fur den Sauerstoffverbrauch Werte erhalten, wie sie in der folgenden Abbildung eingezeichnet sind

Nach 6—7stündigem Schutteln bei 16° ist die Reaktion praktisch beendigt, 0,9 mg Saure haben dann ca 0,134 ccm Sauerstoff aufgenommsn Das ist auf 1 Mol Saure ca 41000 ccm Sauerstoff oder fast 2 Mole Sauerstoff (2 Mole Sauerstoff wären ca 44000 ccm)

b) Die Oxydationskatalyse geht auch im Dunkeln vor sich

c) Kohlensaure bildet sich nicht Wie bei der Oxydation der Linolen-

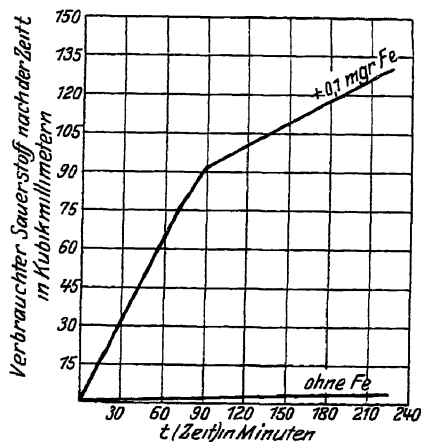
säure ohne Fe[1] nimmt mit der Sauerstoffaufnahme das Jodbindungsvermögen ab Mindestens $^1/_3$ des Jodbindungsvermögens bleibt nach beendeter Sauerstoffaufnahme übrig; da die Oxydation der Ölsäure durch Fe-Salz nicht merklich beschleunigt wird, so liegt die Vermutung nahe, daß diejenige der drei Linolensäure-Doppelbindungen übrigbleibt, die der Ölsäuredoppelbindung entspricht Da ferner 1 Molekul Linolensäure etwa 2 Moleküle Sauerstoff aufnimmt (siehe a), während nur zwei Doppelbindungen verschwinden, so gilt hier dasselbe, was beim Lecithin gesagt wurde: es wird ein Mehrfaches derjenigen Sauerstoffmenge aufgenommen, die zur Überführung der beiden Doppelbindungen in zwei

Abb. 4

|
CHOH
| Gruppen nötig wäre
CHOH
|

d) Von den Beeinflussungen der Oxydationsgeschwindigkeit im System Fe-Linolensäure ist die Wirkung der Basen erwähnenswert Fügt man zu 2 ccm Wasser + 0,9 mg Linolensäure + 0,1 mg Fe 0,2 ccm $^n/_{100}$-NH_3 oder 0,2 ccm $^n/_{100}$-NaOH, also weniger als 1 Mol Base (1 Mol Base wäre 0.33 ccm $^n/_{100}$), so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit zunächst sehr erheblich, etwa um 100% Sie sinkt jedoch bald wieder ab und nach 6—7 Stunden ist nicht erheblich mehr Sauerstoff aufgenommen, als in der Kontrolle ohne Base Setzt man dagegen erheblich mehr Base zu, als 1 Molekul pro 1 Molekul Säure, z B 0 2 ccm $^n/_{10}$-NH_3 oder 0 2 ccm $^n/_{10}$-NaOH, so wird die Linolensäureoxydation fast völlig gehemmt

3 Weinsäure

a) Nach einer bekannten Entdeckung von FENTON[2] werden eine große Anzahl organischer Substanzen durch Wasserstoffsuperoxyd oder andere Oxydationsmittel rasch oxydiert, wenn man Eisenoxydulsalz zugibt Wie H_2O_2 + Fe wirkt auch O_2 + Fe, wenn belichtet wird (FENTON[2], NEUBERG[3])

[1] FAHRION Die Chemie der trocknenden Öle.

[2] FENTON Journ of the chem soc. (London) **65**, 899; **75**, 5; **87**, 804. 1905 und a. a Orten

[3] NEUBERG. Biochem. Zeitschr. **36**, 37. 1911 und a a. Orten.

Die Weinsaure unterscheidet sich nun, wie ich beobachtete, insofern von vielen andern, die Fenton-Reaktion gebenden Substanzen, daß sie auch im Dunkeln bei Zugabe von Eisenoxydulsalz — unter gewissen Konzentrationsverhaltnissen — oxydiert wird Weinsaure Salze geben die Reaktion nicht.

Die Werte, die man fur den Sauerstoffverbrauch beim Mischen von 2,5 ccm $^m/_{10}$- oder $^m/_2$-Weinsaure mit 0,1 ccm 0,8proz. Mohrscher Salzlosung (= 0,1 mg Fe) erhalt, sind aus der folgenden graphischen Darstellung (Abb 5) abzulesen

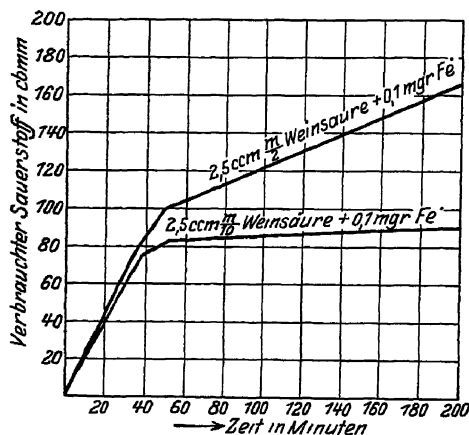



Abb 5

Sauerstoffaufnahme in der Kontrolle ohne Fe habe ich, selbst in langen Zeiten, mit meiner Methode nicht beobachten konnen Die Oxydationsbeschleunigung ist also jedenfalls sehr bedeutend

b) Aus Abb 5 geht hervor, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in dem System Weinsaure-Eisensalz rasch abnimmt Der Grund ist der, daß der Katalysator „verbraucht“ wird, denn erneuter Zusatz von Eisenoxydulsalz hat einen erneuten Anstieg der Oxydationsgeschwindigkeit zur Folge

Der „Katalysatorverbrauch“ ist nun offenbar nichts anderes, als die Überfuhrung des Eisens in die Oxydform, denn Eisenoxydsalz ist nicht imstande, die Weinsaureoxydation zu katalysieren

Diese zuerst paradox erscheinende Tatsache ist auf Grund der Autoxydationstheorie, die von Manchot[1] und Engler[2] fur die Eisensalze aufgestellt wurde, leicht verstandlich und ihrerseits ein neuer Beweis fur die Richtigkeit der Theorie Bei der Oxydation der Eisenoxydulsalze durch Luftsauerstoff entsteht namlich nach Manchot primar nicht Eisenoxyd, sondern ein Eisensuperoxyd, das sich dann mit Eisenoxydul zu Eisenoxyd umsetzt In unserm Fall hatten wir uns also vorzustellen, daß das primar gebildete Eisensuperoxyd durch die Weinsaure nur zum Teil zu Eisenoxydul reduziert wird, zum Teil jedoch durch die Weinsaure nur zu Eisenoxyd reduziert wird, oder sich mit

---

[1] Manchot Zeitschr. f anorg Chem. 27, 420. 1901

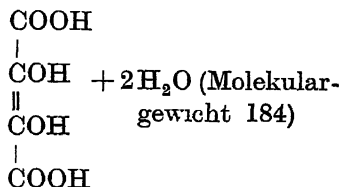
[2] Engler u Weissberg Krit. Studien zur Autoxydation. Braunschweig 1904.

Eisenoxydul zu Eisenoxyd umsetzt So mußte sich die Menge des wirksamen Eisenoxyduls dauernd verringern

c) Was die Beeinflussung der Oxydationsgeschwindigkeit in dem System Fe -Weinsäure anbetrifft, so ist der merkwürdige Einfluß der Neutralsalze erwähnenswert Einige Beispiele sind in der folgenden graphischen Darstellung wiedergegeben, in der die angegebenen Molzahlen bedeuten, daß das System bezüglich des Salzes auf die genannten Molzahlen gebracht wurde.

Abb 6

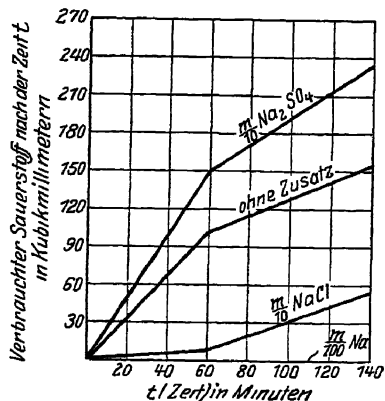
4. Dihydroxymaleinsäure

$$\begin{array}{l} COOH \\ | \\ COH \\ \| \\ COH \\ | \\ COOH \end{array} + 2H_2O \text{ (Molekulargewicht 184)}$$

wurde nach der Vorschrift von FENTON[1] aus Weinsäure und Wasserstoffsuperoxyd, bei Gegenwart von Eisensalz, dargestellt Zum Nachweis der beschleunigenden Wirkung des Eisens wurden je 1 mg in 2 ccm Wasser gelöst und zu einer Probe 0,1 ccm 0,8proz Lösung von MOHRschem Salz (= 0,1 mg Fe) gegeben, während die andere Probe als Kontrolle diente Nach 90 Min bei 20° war dann in der eisenhaltigen Probe etwa zehnmal soviel Sauerstoff verbraucht als in der eisenfreien Probe

Unter den erwähnten Bedingungen kommt die Reaktion nach ca 6 Stunden praktisch zum Stillstand, pro Mol Säure sind dann ca 18000 ccm Sauerstoff also nicht viel weniger als 1 Mol Sauerstoff (1 Mol = ca 22000 ccm) verbraucht

Bei der Reaktion entsteht pro Molekül verschwundenen Sauerstoffs annähernd ein Molekül Kohlensäure Man kann das nachweisen, indem man zwei Atmungsgläschen mit gleichen Mengen Dihydroxymaleinsäure und Eisensalz beschickt in den Einsatz des einen Atmungsgläschens KOH bringt den Einsatz des anderen Atmungsgläschens jedoch leer läßt Während in dem ersten Atmungsgläschen dann die Druckverminderung von der erwähnten Größe auftritt, bleibt der Druck in dem zweiten fast unverändert

5 Andere Eisen-Oxydationskatalysen Von Aldehyden, z B. Önanthol, suspendiert man einige Milligramme in je 2 ccm und gibt zu einer

---

[1] Journ of the chem soc (London) 87, 804. 1905.

Probe 0,1 mg Fe˙, während die andere als Kontrolle dient. Zu bemerken ist dabei, daß der Einsatz *b* keine Kalilauge enthalten darf, da sonst Aldehyd durch Destillation in die Kalilauge gelangt und hier rasch oxydiert wird. — Was die Thioverbindungen anbetrifft, so habe ich selbst mit ihnen nicht experimentiert. Quantitative Angaben findet man bei Matthews und Walker[1] und in einer jüngst erschienenen Arbeit von T. Thunberg[2].

VI. Über die Fähigkeit des in der Eisubstanz natürlich vorkommenden Eisens, Oxydationen zu beschleunigen.

Eine Frage von großer Wichtigkeit ist die, ob das im Ei vorkommende Eisen oxydationskatalytisch wirken kann; sie wird, wie mir scheint, am einfachsten und direktesten so entschieden, daß man der Eisubstanz Körper zusetzt, deren Oxydation durch Eisen katalysiert wird und dann zusieht, wie sich die Sauerstoffaufnahme verhält.

Wäre die Oxydationsgeschwindigkeit in der Granulasuspension sehr labil, würde sie durch viele und verschiedenartige Substanzen beschleunigt, so würde eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei Zusatz durch Fe katalysierbarer Substanzen nicht viel beweisen. Demgegenüber wiederhole ich, was ich schon an anderer Stelle sagte, daß die Oxydation in der Granulasuspension nur durch ganz wenige Arten von Stoffen beschleunigt wird. Zu diesen gehören nur in der Tat Weinsäure und Linolensäure.

Im folgenden sollen einige auf Eisen zu beziehende Beschleunigungen im einzelnen durchgesprochen werden.

a) Das Ei enthält reichliche Mengen Lecithin, die Lecithin-Fe-Katalyse wird durch Säuren beschleunigt; in Übereinstimmung damit wächst die Oxydationsgeschwindigkeit der Eisubstanz unter dem Einfluß von H-Ionen sehr bedeutend.

Zum Nachweis empfehle ich, den Acetonniederschlag der Eisubstanz, der mit Äther gewaschen und dann getrocknet ist, zu benutzen. Reibt man 0,2 g dieses Niederschlags mit 2 ccm Wasser an, so wird in 100 Min. bei 20° 20—35 cmm Sauerstoff absorbiert, Kohlensäure entwickelt sich nicht. Reibt man nicht mit 2 ccm Wasser an, sondern mit 2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, so wird in 100 Min. 60—70 cmm Sauerstoff verbraucht. Statt Salzsäure können mit gleichem Erfolg auch andere Säuren verwendet werden, gerade so wie im System Eisen-Lecithin.

Zu bemerken ist hier, daß es für die Wasserstoffionenkonzentration, wenn eine möglichst große Oxydationsgeschwindigkeit erzielt werden

[1] Journ. of biol. chem. 6. 1909.
[2] Skandinav. Arch. f. Physiol. 30. 285. 1913.

soll, ein Optimum gibt. Dieses Optimum wurde nicht gemessen[1], doch genügt für praktische Zwecke die Angabe, daß Methylviolett, dem Gemisch von Acetonpulver und Säure zugesetzt, einen blauvioletten Farbenton zeigen soll.

b) Von allen untersuchten Säuren abweichend verhielt sich die Weinsäure, für die, unter sonst gleichen Bedingungen, der Zuwachs der Oxydationsgeschwindigkeit weitaus am größten war.

Wurden 0,2 g Acetonpulver mit 2 ccm $^m/_2$-Weinsäure angerieben, so wurden in 100 Minuten bei 20° nicht 60—70 cmm, wie unter dem Einfluß der andern Säuren, sondern 140 cmm Sauerstoff verbraucht, also 70—80 cmm mehr. Es ist mir nicht zweifelhaft, daß diese Ausnahmestellung der Weinsäure darauf beruht, daß sie selbst unter der Eisenwirkung oxydiert wird.

c) Die Linolensäure.

In a und b handelte es sich um Katalysen in stark saurem Milieu, in dem möglicherweise Eisen aus nichtkatalysierfähiger Form in katalysierfähige Form übergeführt worden sein könnte. Es ist deshalb wichtig, daß auch bei Zugabe von Linolensäure — deren gesättigte wässerige Lösung nur ungemein schwach sauer reagiert — die Oxydation in der Eisubstanz sehr erheblich beschleunigt wird.

Die Linolensäureversuche wurden nicht mit dem Acetonpulver, sondern mit der frischgewonnenen Granulasuspension angestellt. Dabei stieß ich auf eine Erscheinung, die als Möglichkeit vorauszusehen war: wenn nämlich das in der Granulasuspension natürlich vorkommende Eisen als Sauerstoffüberträger wirkt, so wird Zugabe einer Substanz, deren Oxydation durch Eisen katalysiert werden kann, keineswegs unter allen Umständen den Gesamtverbrauch an Sauerstoff steigern, z. B. dann nicht, wenn die zugesetzte Substanz dem oxydierten Eisen seinen Sauerstoff nur ebenso schnell oder langsamer fortnehmen kann als die oxydable Substanz des Systems selbst. Dieser Fall ist offenbar für die Linolensäure realisiert, denn der Sauerstoffverbrauch steigt so gut wie nicht, wenn man sie zu der frischen Granulasuspension zusetzt.

Wie wir oben gesehen haben, nimmt die Oxydationsgeschwindigkeit in der Granulasuspension dauernd ab, und wie wir weiterhin gesehen heben, hat nach diesem Abklingen Zusatz von Eisen nur noch eine viel geringere Mehraufnahme von Sauerstoff zur Folge, als anfänglicher Eisenzusatz. Also, nachdem die Oxydation der Granulasuspension abgeklungen ist, enthält sie nur noch wenig durch Eisen oxydierbare Substanz.

---

[1] Das Acetonpulver bindet reichlich Säure, so daß die Wasserstoffionenkonzentration nicht aus der Menge der zugegebenen Säure berechnet werden kann.

Setzt man zu dieser Zeit Linolensaure zu, so beobachtet man jetzt ein starkes Anwachsen des Sauerstoffverbrauchs.

Als Beispiel dieser uberaus wichtigen Verhaltnisse sei ein Versuch in graphischer Darstellung (Abb. 7) wiedergegeben. Die verwendete Granulasuspension war ein wenig verdunnter als sonst, damit ihr Sauerstoffverbrauch schneller nachließe (4 ccm hullenlose, zu einem dichten Sediment zusammenzentrifugierte Eier + 4 ccm S[I], geschuttelt) Je 2 ccm wurden in ein Atmungsglaschen pipettiert und die Atmung bei 23° mehrere Stunden beobachtet und notiert Nach 3 Stunden war sie sehr schwach geworden Nun wurde (Pfeil der Abb 7) in ein Glaschen

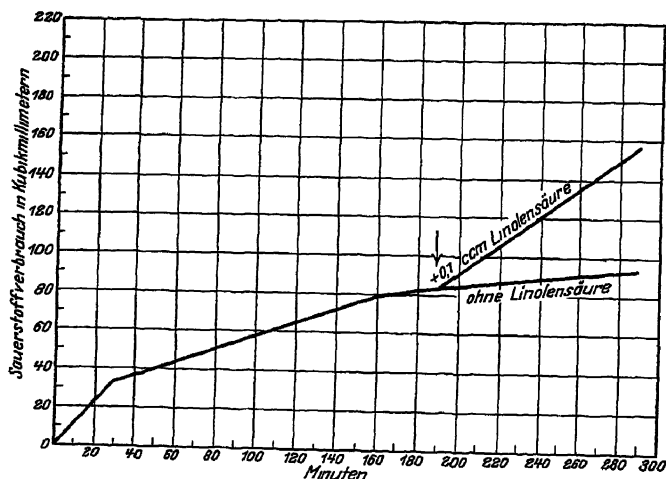



Abb 7

0,1 ccm Linolensaure gegeben (das andere blieb ohne Zusatz), und der Sauerstoffverbrauch weiter beobachtet Nach 100 Min , gerechnet vom Augenblick der Linolenzugabe an, hatte die mit Linolensaure versetzte Probe 88 cmm Sauerstoff verbraucht, die Kontrolle nur 11 cmm Um den durch spontane Oxydation der Linolensaure entstehenden Fehler auszuschalten, wurden gleichzeitig 0,1 ccm Saure in 2 ccm S[I] geschuttelt und die hierbei auftretenden Druckverminderungen von den für Linolensaure + Eisubstanz erhaltenen Werten abgezogen

Es verbrauchten:

	nach 30 Min	nach 100 Min
Linolensaure allein	3	14 cmm O_2
Eisubstanz ,,	3	11 ,, O_2
Linolensäure + ,,	25	88 ,, O_2

Fur die Sauerstoffaufnahme im System Linolensaure + Eisubstanz ist also korrigiert zu setzen:

nach 30 Min. 25 — 3 = 22 cmm O_2
„ 100 „ 88 — 14 = 74 „ O_2

Die korrigierten Werte sind in das Koordinatensystem der Abb. 7 eingetragen.

VII. Theorie.

Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen stelle ich die Theorie auf, daß die Sauerstoffatmung im Ei eine Eisenkatalyse ist; daß der im Atmungsprozeß verzehrte Sauerstoff primär von gelöstem oder adsorbiertem Ferroion aufgenommen wird.

Ein Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung ist durch das Tatsachenmaterial nicht erbracht; wenn auch gezwungen und unter Annahme von Zufälligkeiten, läßt sich die Annahme verteidigen, daß die Atmung zwar durch Eisenzusatz beschleunigt wird, selbst jedoch keine Eisenkatalyse ist.

Daß die Theorie aber eine ungemein wahrscheinliche und einfache Erklärung der verschiedenen Tatsachen gibt, geht vielleicht am besten aus einer kurzen Zusammenfassung der Versuchsergebnisse hervor.

1. Die aus Seeigeleiern gewonnene atmende Flüssigkeit enthält auf 100 mg Stickstoff 0,02—0,03 mg Eisen.

2. Der Acetonniederschlag der Flüssigkeit gibt mit Rhodankali und Salzsäure Eisenionreaktion.

3. Fügt man zu der frisch hergestellten Flüssigkeit kleine Mengen Eisensalz, so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit, höchstwahrscheinlich auch die Geschwindigkeit der Kohlensäureproduktion, und zwar beträgt die Steigerung der Oxydationsgeschwindigkeit 70—100%, wenn man auf 100 mg Stickstoff Hundertstel-Milligramme Eisen zusetzt. Größere Eisenmengen wirken nicht erheblich stärker, bedeutend kleinere Eisenmengen wirken nicht. Die Größenordnungen der bei Zusatz gerade wirksamen Eisenmengen und der im Ei natürlich vorkommenden Eisenmengen sind also gleich.

4. Fügt man das Eisensalz erst zu, nachdem die Atmung sehr schwach geworden ist, so ist der Mehrverbrauch an Sauerstoff viel geringer, als wenn das Eisen zur Zeit der ungeschwächten Atmung zugefügt wird. Der Stoff, auf den das zugesetzte Eisen den Sauerstoff überträgt, wird also offenbar im Atmungsprozeß verbraucht.

5. Der bei Eisenzusatz auftretende Mehrverbrauch an Sauerstoff wird durch das Narkoticum Äthylurethan um fast genau den gleichen Bruchteil gehemmt, wie die Atmung selbst.

6. Setzt man der Flüssigkeit Substanzen zu, deren Oxydation unter dem Einfluß von Eisen beschleunigt wird, so beobachtet man einen Mehrverbrauch von Sauerstoff; die Flüssigkeit verhält sich also als Kataly-

sator wie Eisensalz; oder. das in der Flussigkeit naturlich vorkommende Eisen ist imstande, Oxydationen zu beschleunigen

VIII. Anwendungen der Theorie.

1. Es spricht fur die Theorie, daß eine fundamentale Tatsache der Atmungschemie durch sie sofort erklart ist· die hemmende Wirkung sehr kleiner Blausäuremengen Blausaure wurde mit Fe -Ion das komplexe und katalytisch unwirksame Ferrocyanion bilden Sie wurde in minimalen Mengen wirken, weil auch die umzusetzenden Eisenmengen minimal wären

2 Schon mehrfach fiel es auf, daß die Oxydation in der Zelle große Ähnlichkeit hat mit der Oxydation durch H_2O_2 bei Gegenwart von Eisensalz[1]. Nun bildet sich aus Eisenoxydul bei der Autoxydation zunachst hochstwahrscheinlich ein Superoxyd, und wir hatten dann in der Zelle als Oxydationsmittel Superoxyd[2] bei Gegenwart von Eisenoxydulsalz

Auch die verschiedenen Peroxyd- und Superoxydtheorien der Atmung erhalten von diesem Standpunkt aus ein ganz anschauliches Gesicht

IX. Historische Bemerkung.

Die Vermutung, daß das Eisen im Mechanismus der Atmung eine Rolle spielt, ist wohl schon mehrfach geaußert worden; wußte man doch einerseits, daß das Eisen sehr allgemein in Zellen vorkommt, andererseits, daß es im Reagensglas Oxydationen beschleunigen kann Es handelte sich hier um Vermutungen, die der experimentellen Begrundung ebenso entbehrten, wie die Mangan,- Calcium- oder andere Atmungstheorien[3].

---

[1] Vgl. beispielsweise DAKIN Journ of biol. chem 1, 17 1906

[2] Wasserstoffsuperoxyd oder Eisensuperoxyd

[3] Fur Nichtfachgenossen sei hier bemerkt, daß die Sauerstoffaufnahme des eisenhaltigen Hämoglobins, wie sie beispielsweise im Säugetierblut vor sich geht, mit der Sauerstoffatmung chemisch nichts zu tun hat, das Hamoglobin kommt hier mit den Zellen, an die es den Sauerstoff abliefert, gar nicht in Beruhrung

Kristineberg, den 30. Mai

Biochem. Zeitschr. 113, 257. 1921

Über die Oxydation des Cystins und anderer Aminosäuren an Blutkohle.

Von

Otto Warburg und **Erwin Negelein.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 15. November 1920.)

Mit 4 Abbildungen.

Die Verbrennungsorte in lebenden Zellen sind die Grenzschichten zwischen dem flussigen Zellinhalt und den festen Strukturteilen[1]. Es laßt sich zeigen, daß viele Stoffe in diesen Grenzschichten verdichtet werden

Festen Korpern kommt die Eigenschaft zu, Gasreaktionen zu beschleunigen[2], so wirken Metalle, Quarz, Bernstein, Kohle und andere Stoffe auf die Vereinigung von Wasserstoff und Sauerstoff FARADAY[3] nimmt an, daß hierbei die Verdichtung der reagierenden Stoffe an der Oberfläche der festen Korper eine wesentliche Rolle spiele eine Annahme, die dem Rechnung tragt, was den chemisch verschiedenartigen auf die Knallgasreaktion aber gleichartig wirkenden Korpern gemeinsam ist, namlich ihrem Adsorptionsvermogen

Die Adsorption aus Losungen[4] — mit der wir es in lebenden Zellen zu tun haben — unterscheidet sich von der Adsorption aus Gasraumen durch die Beteiligung des Losungsmittels an der Adsorption Wasser verdrangt adsorbierte Gase von der Kohleoberflache Kohle, die aus Gasraumen große Gasmengen adsorbiert, nimmt aus wasserigen Losungen nur geringe Gasmengen auf, eine Erklarung fur die Tatsache, daß

[1] WARBURG, O Ergebn d Physiol 14, 253 1914, Pflugers Arch f d ges. Physiol. 154, 599. 1913, 158, 19 1914; 158, 189 1914, Sitzungsber d. Heidelberg. Akad. d. Wiss, Mathem.-naturw. Kl 1. 1914

[2] DOEBEREINER. Ann. de chim. et de physiol. 24, 91 1823. — DULONG u. THÉNARD: ebenda 24, 380. 1823. — CALVERT. Cpt rend. Paris 64, 1246. 1867.

[3] FARADAY: Experimentaluntersuchungen. Ostwalds Klassiker 87, 21ff.

[4] FREUNDLICH, H.: Zeitschr f. physikal. Chem. 57, 385. 1907.

wasserige Kohlensuspensionen die Vereinigung von Wasserstoff und Sauerstoff nicht merklich beschleunigen

Andererseits sind Falle bekannt, in denen die Adsorption aus Lösungen chemische Reaktionsbeschleunigungen bedingt So beobachteten FREUNDLICH[1] und MASIUS, daß eine wasserige Oxalsäurelosung in Beruhrung mit Kohle bei Zimmertemperatur unbeständig ist Ich habe gefunden[2], daß die Oxalsäure an Kohle zu Kohlensaure und Wasser verbrennt[3]. Es sei bemerkt, daß indifferente Narkotica diese Oberflachenoxydation nach denselben Gesetzmaßigkeiten hemmen, wie die Verbrennungen in lebenden Zellen

Ein zweiter naher untersuchter Fall ist die Oxydation des Phenylthioharnstoffs, der nach FREUNDLICH und BJERCKE[4] an der Kohleoberflache rasch oxydiert wird Den zeitlichen Verlauf bestimmt nach den genannten Autoren die Geschwindigkeit, mit der der Sauerstoff durch eine Adsorptionsschicht zur Kohleoberflache hindiffundiert.

Ein dritter Fall soll in der vorliegenden Mitteilung beschrieben werden, die Oxydation des Eiweißspaltproduktes Cystin, einer bestandigen schwefelhaltigen Aminosaure, die durch mehrstundiges Kochen von Eiweiß mit starker Salzsaure gewonnen wird Bringt man in verdunnte wässerige Cystinlosungen Blutkohle und schüttelt bei 40° mit Luft oder Sauerstoff, so verschwindet die Aminosaure unter Sauerstoffaufnahme, wahrend gleichzeitig Kohlensaure, Ammoniak und Schwefelsaure als Endprodukte auftreten, das heißt, die Endprodukte der Eiweißverbrennung in lebenden Zellen

Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist eine außerordentlich große Vergleichen wir die Geschwindigkeiten der Sauerstoffaufnahme durch 1 g Kohle und durch 1 g eines stark atmenden Gewebes, etwa der Warmbluterleber, so finden wir sie gleich, wenn die Kohle mit einer $^1/_{500}$ molaren Cystinlosung im Gleichgewicht ist

Wie Cystin verbrennen viele Aminosauren an Kohle, beispielsweise Leucin und Tyrosin. Andere biologisch wichtige Stoffe — Zucker, Fettsauren, Milchsäure, Apfelsaure — sind im Vergleich zu den Aminosauren an Kohle bestandig So nehmen kohlehaltige Traubenzuckerlosungen bei 40° keine merklichen Sauerstoffmengen auf; dies ist um so auffallender, als Traubenzucker unter andern Bedingungen recht reaktionsfahig ist und im Reagensglas unter dem Einfluß von Alkalien[5],

[1] FREUNDLICH, H. Capillarchemie Leipzig 1909. S. 163ff

[2] WARBURG, O Pflugers Arch. f. d ges. Physiol. 155, 547. 1914

[3] Zusatz beim Neudruck Statt dieses Satzes steht in der Originalarbeit. „und eine nahere Verfolgung dieser Beobachtung ergab, daß die Oxalsaure hier zu Kohlensaure und Wasser verbrennt"

[4] FREUNDLICH, H. u. BJERCKE Zeitschr f physikal Chem. 91, 1. 1916.

[5] MATHEWS Journ of biol chem. 6, 3. 1909.

von Kupfersalzen[1] und von kolloidalem Palladium[2] leicht oxydiert werden kann

Die Wiedergabe der Versuche zerfallt in folgende Abschnitte

I. Methoden
II. Bindung des Cystins an Kohle.
III. Oxydation des Cystins an Kohle
IV Endprodukte der Cystinoxydation.
V. Einfluß der Temperatur auf die Cystinoxydation
VI Oxydation des Cysteins an Kohle
VII Oxydation des Tyrosins an Kohle
VIII. Oxydation des Leucins an Kohle
IX Anhang

I. Methoden.

1 Die verwandte Kohle war MERCKS „Tierblutkohle, hochwertig, biologisch gepruft" In wasseriger Suspension bei 40° mit Sauerstoff geschuttelt, nimmt sie weder Sauerstoff auf, noch gibt sie Kohlensäure ab Verdunnte Salzsaure entwickelt nur Spuren Kohlensaure und vermag der Kohle nur Spuren von Ammoniak zu entziehen Mit Wasser bei 40° extrahiert, gibt sie nur Spuren von Schwefelsaure ab. Naheres uber die Kontrollen findet man bei der Beschreibung der Versuche

KAHLBAUMS Blutkohle steht in der Wirkung auf die Cystinoxydation kaum hinter dem Merckschen Praparat zuruck Sie ist jedoch weniger rein und gibt insbesondere an verdunnte Salzsaure merkliche Mengen Ammoniak ab

2 Das Cystin war aus Haaren durch Kochen mit Salzsaure in der ublichen Weise dargestellt 0,4545 g, mit Normalsalzsaure zu 15 ccm aufgelost, drehten die Polarisationsebene von Natriumlicht im 1-Dezimeterrohr bei Zimmertemperatur 6,55° nach links Daraus ergibt sich $[\alpha]_D = -216°$, wahrend E FISCHER und SUSUKI[3] unter gleichen Bedingungen $[\alpha]_D = -222°$ fanden Das Praparat enthielt also etwa 1,5% der rechtsdrehenden Form

Die spezifische Drehung von Cystin, in Normalsalzsaure gelost, ist von der Konzentration ziemlich unabhangig 0,067 g, mit Normalsalzsaure auf 100 ccm aufgelost, ergaben im 2-Dezimeterrohr ein $\alpha_D = -0,29°$, woraus sich $[\alpha]_D = -216°$ berechnet Eine derartige Losung ist etwa $3 \cdot 10^{-3}$ normal

Zur Herstellung der Versuchslosungen wurde Cystin fein gepulvert,

---

[1] MATHEWS u. MC. GUIGAN: Americ journ. of physiol. 19, 199 1907.
[2] WIELAND. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 46, 3327. 1914.
[3] Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol Chem. 45, 405. 1905.

mit der 1000fachen Menge Wasser gekocht, heiß von wenig ungelostem filtriert, abgekühlt und in einem Teil der so erhaltenen ubersattigten Lösung (für aktives Cystin wird eine Loslichkeit von 1 9000 bei Zimmertemperatur angegeben) nach Zugabe von 10% 10fach Normalsalzsaure der Cystingehalt polarimetrisch, unter Einsetzung des Wertes $[\alpha]_D = -216^0$, ermittelt. Der Rest der Losung wurde dann, gegebenenfalls nach passender Verdünnung, zum Versuch verwendet.

3 Das Cystein wurde nach der Vorschrift von E FRIEDMANN[1] aus Cystin durch Reduktion mit Zinn und Salzsaure als Chlorhydrat dargestellt. 0,0424 g, in 96proz Alkohol gelost und nach KLASON und CARLSON[2] titriert, verbrauchten die berechnete Menge von 2,7 ccm $\frac{n}{10}$-Jodlosung

4 Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung wurden nach früher beschriebenen Methoden bestimmt, indem die Kohlesuspensionen mit relativ großen Gasmengen in verschlossenen Gefaßen im Thermostaten geschuttelt und die entstehenden und verschwindenden Gasmengen aus den Druckänderungen berechnet wurden, die angeschlossene HALDANE-BARCROFTsche Blutgasmanometer zeigten (Form der Gefaße, diese Zeitschr. **110**, 72 1920; Formeln zur Berechnung des Gaswechsels ebenda, Seite 73 und am Kopf des Abschnittes IX) Die Druckanderungen, die hierbei auftraten, waren, je nach der verwandten Cystinmenge, einige hundert bis einige tausend Millimeter der BRODIEschen Manometerflussigkeit (von der 10000 mm = 760 mm Hg)

Die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlensaurebildung aus den Druckanderungen setzt voraus, daß außer Sauerstoff und Kohlensaure Gase weder verschwinden, noch entstehen Da an die Moglichkeit gedacht werden mußte, daß Kohlenoxyd bei der Cystinoxydation gebildet werde, wurde eine gasanalytische Kontrolle gemacht Durch einen beiderseitig mit Schwanzhahnen verschließbaren Rezipienten, der zur Halfte mit cystinhaltiger Kohlesuspension gefullt war, wurde zunachst 30 Minuten lang elektrolytisch entwickelter Sauerstoff, der ein mit Kupferoxyd beschicktes gluhendes Quarzrohr passiert hatte, durchgeleitet Dann wurden die Hahne geschlossen, eine passende Zeit im Thermostaten geschuttelt, und hierauf ein Teil der Gase in den Haldaneschen Analysenapparat eingesaugt Es zeigte sich nach Absorption durch Kalilauge und Hydrosulfit, daß der Gasrest nicht merklich zugenommen hatte (Anhang Nr 1), also andere Gase neben Kohlensaure nicht entstanden waren

Eine zweite Kontrolle betraf die Frage, wieweit das Adsorptionsvermogen der Kohle fur Kohlensaure die Resultate beeinflusse Be-

---

[1] Hofmeisters Beitr. 4, 504 1904

[2] Chem. Zentralbl. 1906, S. 1090.

schickt man 2 Gefaße von je 30 ccm Inhalt mit je 10 ccm einer $^1/_{2000}$ molaren Natriumcarbonatlosung, gibt in das eine außerdem 0,2 g Kohle, verschließt mit den Manometern, schüttelt zunachst im Thermostaten, bis Temperatur- und Druckgleichgewicht eingetreten ist und kippt nun, ohne zu offnen, aus einem Einsatz je 1 ccm $^n/_{10}$-Salzsaure in die Carbonatlösung, so wird aus der kohlehaltigen Flussigkeit eine um etwa 10% kleinere Kohlensauremenge an den Gasraum abgegeben als aus der kohlefreien Flussigkeit In dieser Großenordnung liegen die Fehler bei der Kohlensaurebestimmung, die aus den Druckänderungen berechnete Kohlensaurebildung wird um etwa 10% zu klein gefunden Der an sich nicht unbedeutende Fehler stort jedoch die Beurteilung des Oxydationsverlaufes nicht wesentlich

Ähnliche Schwierigkeiten bestehen fur die Ammoniak- und Schwefelsaurebestimmung. Die Mengen an Reaktionsprodukten, die wir bei Kohleversuchen messen, sind in diesem Sinn allgemein Minimalzahlen.

5. Zur Bestimmung des Ammoniaks wurde eine cystinhaltige Kohlesuspension eine passende Zeit mit Sauerstoff bei 40° geschuttelt, dann auf 10 ccm 1 ccm $^n/_{10}$-Salzsaure zugegeben, filtriert und mit $^n/_{100}$-Salzsaure bis zum Verschwinden der Ammoniakreaktion gewaschen Aus einem aliquoten Teil der vereinigten Filtrate wurde nach Zugabe von $^1/_{10}$ Volumen 10proz Kaliumcarbonatlosung mittels eines Luftstroms[1] das Ammoniak ausgetrieben, in $^n/_{50}$-Salzsaure aufgefangen und die ubergegangene Ammoniakmenge in bekannter Weise colorimetrisch ermittelt

Vielleicht wurden etwas großere Ammoniakmengen erhalten worden sein, wenn wir die Kohle mit Salzsaure ausgekocht hatten doch war die Anwendung hoherer Temperaturen aus naheliegenden Grunden zu vermeiden

6 Zur Bestimmung der Schwefelsaure wurde durch eine cystinhaltige Kohlesuspension bei 40° eine passende Zeit Sauerstoff geleitet, dann filtriert die Kohle 2mal mit einer großeren Menge Wasser angerieben und filtriert, die neutral reagierende Flussigkeit auf dem Wasserbade eingeengt, nach Zusatz von Salzsaure mit Bariumchlorid gefallt und das Bariumsulfat gewogen

II. Bindung des Cystins an Kohle.

Abderhalden und Fodor[2] haben gezeigt, daß Aminosauren von Blutkohle gebunden werden, zwischen der von der Kohle gebundenen

---

[1] Methode von Folin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol Chem. 37, 161. 1902/03 und Abderhalden: Biochem. Arbeitsmethode 7, 715 1913.

[2] Zeitschr. f. Fermentforschung 2, 74 1917; 2, 151. 1918.

Menge und der Konzentration in der Lösung besteht bei kleinen Aminosaurekonzentrationen einfache Proportionalitat

Leider sehen wir zunachst keinen Weg, die Bindung des Cystins an Kohle bei verschiedenen Konzentrationen in befriedigender Weise zu messen Die Schwierigkeit liegt einerseits in der Unbestandigkeit des von der Kohle aufgenommenen Cystins, andererseits in der Schwerlöslichkeit dieser Aminosaure Schuttelt man Cystinlosungen mit Kohle, so enthalten die klaren Filtrate stets Kohle in feiner Verteilung, die sich vollstandig nur durch Eindampfen bis zur Trockene entfernen laßt, hierbei wird das Cystin weiter zersetzt Dampft man nicht ein, so sind die Losungen zur polarimetrischen Bestimmung zu verdunnt, wahrend Stickstoffbestimmungen durch den in der Kohle enthaltenen Stickstoff fehlerhaft werden.

Unter diesen Verhaltnissen konnte die Bindung des Cystins an Kohle nur fur eine Konzentration ermittelt werden, indem zu einer gesattigten Cystinlösung (Löslichkeitsbestimmung Abschnitt IX, Nr. 2) so viel Kohle zugegeben wurde, daß die polarimetrische Bestimmung im Filtrat, nach erfolgter Adsorption, noch eben mit einiger Genauigkeit (auf 10%) möglich war. Es wurde so gefunden, daß 1 g Kohle, im Gleichgewicht mit einer $0{,}58 \cdot 10^{-3}$ molaren Cystinlosung, 0,083 Millimole Cystin enthalt (Abschnitt IX, Nr 3)

Anschaulicher kann das Resultat der Adsorptionsmessung so ausgedruckt werden: Gibt man zu 100 ccm einer 0,034proz Cystinlosung 1 g Kohle, so verschwinden infolge der Adsorption etwa 60% der Aminosaure aus der Losung.

III. Oxydation des Cystins an Kohle.

1. Schuttelt man wasserige Cystinlosungen in neutraler, saurer oder alkalischer Losung bei 40° mit Sauerstoff von Atmospharendruck, so wird kein Sauerstoff aufgenommen, auch nach Zusatz von Metallsalzen, die in anderen Fallen als Sauerstoffubertrager wirken, beispielsweise von Eisensalzen, ist Cystin unter den genannten Bedingungen bestandig

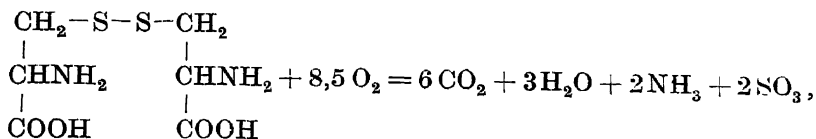
Schuttelt man wasserige Kohlesuspensionen bei 40° mit Sauerstoff von Atmospharendruck, so wird kein Sauerstoff aufgenommen

Dagegen absorbieren wasserige Cystinlösungen, in denen Kohle suspendiert ist, Sauerstoff mit großer Geschwindigkeit

2 Verbrennt Cystin[1] zu Kohlensaure, Wasser, Ammoniak und Schwefelsaure, nach der Gleichung

---

[1] Konstitution des Cystins vgl. C. Neuberg: Ber. d. Dtsch. Chem Ges 35, 3161 1902; E. Friedmann. Hofmeisters Beitr. 3, 1. 1902; Erlenmeyer: Ber. d. Dtsch Chem Ges. 36, 2720 1903; E Fischer u. Raske: Ber. d Dtsch Chem. Ges. 41, 893 1908.

$$\begin{array}{ll} CH_2-S-S-CH_2 & \\ \quad | \qquad\qquad | & \\ CHNH_2 \qquad CHNH_2 & + 8{,}5\,O_2 = 6\,CO_2 + 3\,H_2O + 2\,NH_3 + 2\,SO_3, \\ \quad | \qquad\qquad | & \\ COOH \qquad COOH & \end{array}$$

(Molekulargewicht 240)

so werden 8,5 Moleküle Sauerstoff verbraucht, während 6 Moleküle Kohlensäure, 2 Moleküle Ammoniak und 2 Moleküle Schwefelsäure entstehen. Der Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ ist für diesen Vorgang gleich 0,71.

3. Von den zahlreichen Versuchen, die wir mit verschiedenen Kohlepräparaten, wechselnden Kohlemengen und Cystinkonzentrationen ausgeführt haben, sei zunächst folgendes Beispiel näher beschrieben.

In 4 Meßgefäße von ungefähr (Genaueres Anhang Nr. 4) 30 ccm Inhalt wurden je 2 ccm einer übersättigten Cystinlösung, die in 2 ccm 1,97 mg Substanz enthielten, sowie je 40 mg Merckscher Blutkohle eingefüllt. Nachdem der Einsatz der Meßgefäße zur Absorption etwa gebildeter Kohlensäure mit je 1 ccm 5proz. Kalilauge beschickt war, wurde mit den Manometern verbunden, die Gasräume mit verschiedenen Sauerstoff-Stickstoffmischungen gefüllt und bei 40° mit der Kohlesuspension ins Gleichgewicht gebracht. Die Gasmischungen enthielten 97, 63, 20,9 und 5,1% Sauerstoff, der Gesamtdruck bei Schluß der Hähne war 760 mm Hg, woraus sich, unter Berücksichtigung der Wasserdampftension, Sauerstoffpartialdrucke von 684, 444, 147 und 36 mm Hg berechnen (Sauerstoffkonzentrationen von $0{,}92 \cdot 10^{-3}$, $0{,}6 \cdot 10^{-3}$, $0{,}2 \cdot 10^{-3}$ und $0{,}049 \cdot 10^{-3}$ Molen pro Liter Flüssigkeit). Der Sauerstoffvorrat in den drei Gefäßen mit höheren Sauerstoffdrucken war bei dieser Anordnung so groß, daß die Sauerstoffkonzentration bis zur Beendigung der Oxydation als konstant betrachtet werden konnte; das gleiche gilt nicht für das vierte Gefäß, für das deshalb nur die Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme gemessen wurde.

Die Druckänderungen, die beim Schütteln der Gefäße auftraten, sind in Tabelle 1 (in Millimetern Brodiescher Flüssigkeit) verzeichnet, daneben die unter Berücksichtigung der Volumina berechneten Sauerstoffaufnahmen in Kubikmillimetern. Hierbei entsprach einem Millimeter Druckabnahme durchschnittlich ein Sauerstoffverbrauch von 2,4 cmm Sauerstoff. Die Kurve Abb. 1 ist eine graphische Wiedergabe desselben Versuchs, die Abszissen bedeuten die Minuten nach Schluß der Hähne, die Ordinaten die nach t Minuten verbrauchten Sauerstoffmengen in Kubikmillimetern.

4. Sehen wir zunächst von dem zeitlichen Verlauf der Sauerstoffaufnahme ab und betrachten die Endwerte, die sich durch Extrapolation aus den Kurven ergeben. Für totale Verbrennung von 1,97 mg Cystin

berechnet sich ein Sauerstoffverbrauch von 1563 cmm Demgegenüber werden tatsachlich verbraucht·

Bei einem Sauerstoffdruck von mm Hg	cmm Sauerstoff
684	580
444	560
147	476

Die Verbrennung ist also unvollstandig, um so unvollständiger, je niedriger der Sauerstoffdruck Steigt der Sauerstoffdruck von 147 auf 684 mm Hg, so steigt der Endwert der Sauerstoffaufnahme von 31% auf 38% der für totale Verbrennung berechneten

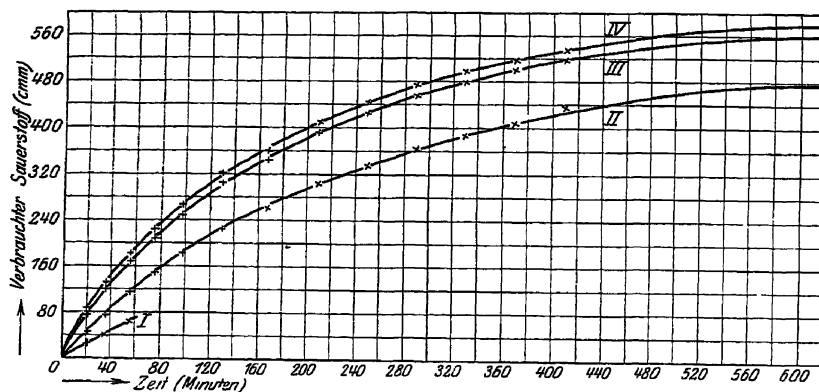



Abb 1 1,94 mg Cystin, 40 mg Kohle, 2 ccm Wasser 40° I O_2-Partialdruck 36 mm Hg, II O_2-Partialdruck 147 mm Hg, III O_2-Partialdruck 444 mm Hg, IV O_2-Partialdruck 684 mm Hg

Tabelle 1. *1,97 mg Cystin, 40 mg Kohle, 2 ccm H_2O 40°*

Zeit (Minuten)	O_2-Druck 684 mm Hg		O_2-Druck 444 mm Hg		O_2-Druck 147 mm Hg		O_2-Druck 36 mm Hg	
	Beobachtete Druckänderung mm	Sauerstoffverbrauch cmm	Beobachtete Druckänderung mm	Sauerstoffverbrauch cmm	Beobachtete Druckänderung mm	Sauerstoffverbrauch cmm	Beobachtete Druckänderung mm	Sauerstoffverbrauch cmm
21	— 36,5	84	— 31,5	75	— 18,5	45	— 10,5	26
36	— 57	131	— 50	120	— 31	75	— 17	41
56	— 79	182	— 70,5	168	— 47,5	115	— 26	63
76	— 97,5	224	— 87	208	— 61	148		
98	— 116	267	— 104	249	— 75	182		
130	— 140,5	323	— 127,5	305	— 93	225		
168	— 157	361	— 144	344	— 107,5	260		
210	— 178	409	— 163,5	391	— 125	303		
250	— 193	444	— 178	425	— 138,5	335		
290	— 206	474	— 190,5	455	— 150,5	364		
330	— 216	497	— 200,5	479	— 160	387		
370	— 224,5	516	— 209	500	— 168,5	408		
410	— 232	534	— 216,5	517	— 180	436		
∞		580		560		476		

Ist die Sauerstoffaufnahme beendigt, so laßt sich kein unverandertes Cystin mehr nachweisen, weder polarimetrisch, noch durch die MORNERsche Schwefelbleireaktion — Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme steigt nahezu auf ihren Anfangswert, wenn nach Stillstand der Oxydation die Cystinkonzentration durch Zugabe neuer Substanz auf ihren Anfangswert gebracht wird. Es scheint also, daß die Reaktionsprodukte nur wenig hemmen

5 Betrachten wir weiterhin den zeitlichen Verlauf der Oxydation, indem wir die Annahme zugrunde legen. daß sie, wenn auch unvollstandig, so doch bei einem bestimmten Sauerstoffdruck in jedem Augenblick gleichartig ist Wir durfen dann die nach t Minuten oxydierte Cystinmenge x dem nach t Minuten verbrauchten Sauerstoff, die Anfangsmenge an Cystin A dem nach unendlicher Zeit verbrauchten Sauerstoff proportional setzen Tun wir das, so findet sich, daß der Ausdruck $\frac{1}{t}\ln\frac{A}{A-x}$ nahezu konstant ist (Tabelle 2), und zwar ist die Konstanz besonders befriedigend fur den Sauerstoffdruck von 147 mm Hg

Tabelle 2

t (Minuten)	$\frac{1}{t}\ln\frac{A}{A-x}\cdot 10^3$		
	O_2-Druck 684 mm Hg	O_2-Druck 444 mm Hg	O_2-Druck 147 mm Hg
21	7,4	6,9	4,7
36	7,1	6,7	4,8
56	6,7	6,4	4 9
76	6,7	6,2	4,9
98	6,2	6,0	4,9
130	5,8	6,0	4,9
168	5,8	5,8	4 7
210	5,8	5,8	4,8
250	5,8	5,8	4,9
290	5,8	5,8	5,0
330	6,0	6,0	5,1
370	5,8	6,0	5,2
410	[5,8]	[6,4]	[6,0]
Mittel:	6,2	6,1	4,9

Die Konstanz des Ausdrucks $\frac{1}{t}\ln\frac{A}{A-x}$ bedeutet, daß die verschwindende Cystinmenge der in jedem Augenblick vorhandenen Gesamtmenge an Cystin proportional ist, und zwar verschwindet pro Minute — da $k = \frac{\frac{dx}{dt}}{A-x}$ — bei einem Sauerstoffdruck von 684 mm Hg

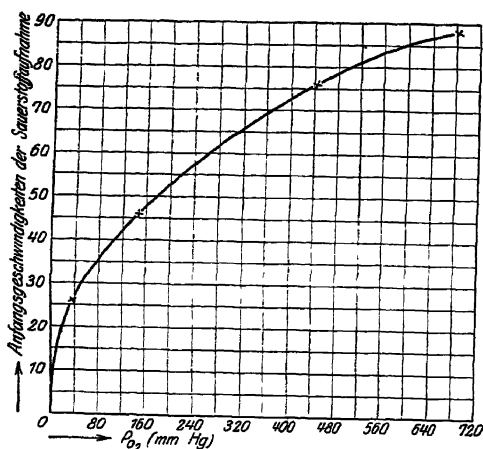
0,62%, bei einem Sauerstoffdruck von 444 mm Hg 0,61% und bei einem Sauerstoffdruck von 147 mm Hg 0,49% der jeweils vorhandenen Cystinmenge.

Bei Sauerstoffdrucken über 100 mm Hg und bei 40° war $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$ in allen Versuchen nahezu konstant, doch waren die Zahlenwerte für die Konstanten in verschiedenen Versuchen, je nach den benutzten Kohlenpräparaten, unter sonst gleichen Bedingungen verschieden, bei einem konstanten Sauerstoffdruck von 700 mm Hg lagen sie zwischen $5 \cdot 10^{-3}$ und $11 \cdot 10^{-3}$ (vgl. auch Nr. 7 dieses Abschnittes und Abschnitt V).

Die Tatsache, daß die Geschwindigkeit der Reaktion der jeweils vorhandenen Cystinmenge proportional ist, besagt, worauf besonders hingewiesen sei, nichts über den Mechanismus des Vorgangs, sie ist sowohl mit der Annahme verträglich, daß der Fortschritt der Reaktion durch monomolekularen Zerfall des Cystins in einer homogenen Adsorptionsschicht bestimmt wird, als auch mit der Annahme[1], daß die Diffusion des Cystins durch eine adhärierende oder Adsorptionsschicht für den zeitlichen Verlauf maßgebend ist.

Abb. 2. 1,94 mg Cystin, 40 mg Kohle, 2 ccm Wasser. 40°.

6. Weniger übersichtlich ist die Beziehung zum Sauerstoffdruck, der nach dem Vorhergehenden auf zweierlei Art wirkt: einerseits wachsen die Werte für $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$, andererseits die Endwerte mit wachsendem Sauerstoffdruck. Es ändert sich also nicht nur die Geschwindigkeit der Cystinzerstörung, sondern auch der Reaktionsmodus. Eine einfache Beziehung ist hier nicht zu erwarten.

Der Einfluß des Sauerstoffdrucks tritt mehr hervor, wenn man nicht die Geschwindigkeitskonstanten, sondern einfach die Sauerstoffaufnahmen für gleiche Zeiten und gleiche Cystinmengen bei verschiedenen Sauerstoffdrucken vergleicht. Entnimmt man aus Abb. 1 die nach 21 Minuten verbrauchten Sauerstoffmengen — die Cystinmenge kann

[1] Vgl. Kinetik heterogener Reaktionen bei NERNST. Theor. Chemie. Stuttgart 1913. S. 610.

nach dieser Zeit als unverandert betrachtet werden —, tragt sie als Ordinaten auf. die zugehorigen Sauerstoffdrucke als Abszissen, so erhält man das Bild der Abb 2.

7. Als zweites Beispiel sei ein Versuch mit einem anderen Praparat gleichfalls MERCKscher Blutkohle angeführt (Tabelle 3, Anhang Nr. 5), mit gleichen Cystin- und Kohlekonzentrationen, jedoch der 5fachen absoluten Menge an allen Stoffen Der Verlauf entspricht dem des ersten Beispiels

Tabelle 3.

9,7 mg Cystin. 200 mg Kohle, 10 ccm H_2O 40°. Sauerstoffdruck 700 mm Hg

t (Minuten)	Beobachtete Druckveranderung mm	Sauerstoff-verbrauch cmm	$\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x} \cdot 10^3$
19	— 184	311	6,0
40	— 377	637	6,2
68	— 577	975	6,0
104	— 767	1296	5,8
152	— 968	1636	5,5
212	— 1157	1955	5,3
292	— 1336	2258	5,1
359	— 1447	2445	5,1
421	— 1531	2587	5,3
451	— 1565	2645	5,5
512	— 1622	2741	5,5
594	— 1684	2846	[6.7]
∞		2900	

Mittel 5,6

8 Mit Hinblick auf den Gedankengang. der dieser Arbeit zugrunde liegt, wollen wir schließlich fragen. wie groß die Wirksamkeit der Kohle als Oxydationskatalysator im Vergleich zur Wirksamkeit lebenden Gewebes ist BARCROFT und SHORE[1] fanden fur die Saugetierleber — eines der am starksten atmenden Warmbluterorgane — im lebenden Tier eine Sauerstoffaufnahme von 1 5—15 ccm pro Stunde bezogen auf 1 g Trockensubstanz im Mittel also etwa 8 ccm pro Stunde Aus Tabelle 1 entnehmen wir, daß bei einem Sauerstoffdruck von 700 mm Hg von 40 mg Kohle bei Korpertemperatur in den ersten 21 Minuten 84 cmm Sauerstoff aufgenommen werden. das heißt von 1 g Kohle pro Stunde 6,3 ccm Die Anfangskonzentration des Cystins in der Losung betrug hierbei $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter Wir konnen also sagen. daß Kohle , im Gleichgewicht mit einer $1{,}7 \cdot 10^{-3}$ molaren Cystinlosung, als Oxydationskatalysator die Wirksamkeit von lebendem Lebergewebe fast erreicht.

[1] Journ of physiol. 45, 296. 1912.

IV. Endprodukte der Cystinoxydation.

1,2 g Cystin wurden feingepulvert mit 1200 ccm Wasser einige Zeit gekocht, heiß von wenig Ungelostem abfiltriert und nach dem Abkühlen der Cystingehalt der ubersattigten Losung polarimetrisch ermittelt, der sich zu 97 mg auf 100 ccm ergab. Dann wurde zu je 100 ccm der (übersattigten) Losung 2 g MERCKscher Blutkohle gegeben und Sauerstoffverbrauch und Endprodukte fur eine Versuchszeit von 6 Stunden in passenden Mengen der Suspension bestimmt

1. *Schwefelsäure*. Durch 1000 ccm Suspension, die 970 mg Cystin enthielten, wurde 6 Stunden lang bei 40° eine Gasmischung von 97% Sauerstoff und 3% Stickstoff geleitet Das Filtrat der Kohle gab nach dieser Zeit mit Bariumchlorid in salzsaurer Losung eine starke Fallung. Filtrate und Waschwasser wurden, wie in I beschrieben, verarbeitet Erhalten 0,2120 g Bariumsulfat, berechnet fur totale Verbrennung 1,88 g Bariumsulfat Es war also 11% des Cystinschwefels als Schwefelsaure erschienen

Zur Kontrolle wurde durch eine gleiche Menge wasseriger cystinfreier Kohlensuspension bei 40° 16 Stunden lang die gleiche Gasmischung durchgeleitet, die vereinigten, auf 200 ccm eingedampften Filtrate und Waschwasser zeigten mit Bariumchlorid erst nach langerem Stehen eine eben merkliche Trubung Kohle gibt also unter den Bedingungen unserer Anordnung keine in Betracht kommenden Schwefelsauremengen ab.

2 *Ammoniak* 10 ccm Suspension, die 9,7 mg Cystin enthielten, wurden bei 40° 6 Stunden lang mit einer Gasmischung geschuttelt, die 97% Sauerstoff und 3% Stickstoff enthielt Dann wurde 1 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure zugegeben, filtriert, mit $^{n}/_{100}$-Salzsaure gewaschen, Filtrat und Waschwasser vereinigt und das Ammoniak nach FOLIN bestimmt Erhalten 0,4 mg Ammoniak, berechnet fur totale Verbrennung 1,4 mg Ammoniak Es war also 29% des Cystinstickstoffs als Ammoniak erschienen.

Zur Kontrolle wurde ein zweiter Versuch angestellt, in dem statt Cystinlösung destilliertes Wasser 6 Stunden bei 40° mit Sauerstoff und Kohle geschuttelt und dann weiter wie oben verfahren wurde Erhalten 0,002 mg Anmoniak Diese Kontrolle, in die auch der Ammoniakgehalt der Reagenzien eingeht, zeigt, daß die Kohle unter unseren Versuchsbedingungen keine in Betracht kommenden Ammoniakmengen abgibt

Sowohl die Schwefelsaure- als auch die Ammoniakbildung aus Cystin unter dem Einfluß von Kohle laßt sich bequem im Lauf eines mehrstündigen Versuches zeigen Leitet man durch Reagensrohrchen, die 10 ccm

einer 0,1 proz. (übersättigten) Cystinlösung und 0,2 g Kohle enthalten, unter Erwärmung auf 40° Sauerstoff, so geben die Filtrate schon nach kurzer Zeit kräftige Schwefelsäure- und Ammoniakreaktion. Bemerkt sei, daß NESSLERS Reagens, direkt zu den Filtraten zugesetzt, erst richtige Resultate gibt, wenn das Cystin praktisch völlig aus der Lösung verschwunden ist.

3. *Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung.* In zwei ungefähr gleich große Meßgefäße wurden je 10 ccm der Suspension, die je 9,7 mg Cystin enthielten, eingefüllt: in den Einsatz des ersten Gefäßes außerdem 1,5 ccm 5 proz. Kalilauge. Der Einsatz des zweiten Gefäßes blieb leer. Dann wurde mit den Manometern verbunden und bei 40° mit einer Mischung von 97% Sauerstoff und 3% Stickstoff gesättigt. Beim Schütteln zeigte das Manometer des ersten Gefäßes die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks an, das Manometer des zweiten Gefäßes die Summe der Sauerstoff- und Kohlensäuredruckänderungen. Nach 6 Stunden betrug die Druckänderung im ersten Gefäß —1447 mm, im zweiten Gefäß —901 mm BRODIEscher Flüssigkeit. Daraus berechnet sich, unter Berücksichtigung der Gefäßvolumina und der Absorptionskoeffizienten der Gase (vgl. Anhang Nr. 6), ein Sauerstoffverbrauch von 2445 cmm und eine Kohlensäureproduktion von 1037 cmm. Bei totaler Verbrennung des Cystins mußten 7690 cmm Sauerstoff verschwunden und 5150 cmm Kohlensäure erschienen sein. Nach 6 Stunden war also 32% der berechneten Sauerstoffmenge verbraucht und 20% der berechneten Kohlensäuremenge erschienen.

Zur Kontrolle wurde ein zweiter Versuch angestellt, in dem an Stelle der Cystinlösung destilliertes Wasser 6 Stunden mit 0,2 g Kohle und Sauerstoff geschüttelt wurde. Hierbei wurden an den Manometern beider Meßgefäße Druckänderungen nicht beobachtet. Eine wässerige Kohlesuspension verbraucht also unter unseren Versuchsbedingungen weder Sauerstoff noch gibt sie Kohlensäure ab.

Eine zweite Kontrolle betraf die Frage, ob etwa durch die bei der Cystinoxydation entstehende Säure Kohlensäure aus der Kohle freigemacht werde. Zur Entscheidung wurden 2 Meßgefäße mit je 10 ccm einer 2 proz. wässerigen Kohlesuspension beschickt, die Einsätze mit je 1 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure gefüllt, dann mit den Manometern verbunden und bei 40° mit Sauerstoff von Atmosphärendruck gesättigt. Hierauf wurden die Hähne geschlossen und die Salzsäure des einen Meßgefäßes alsbald in die Kohlesuspension eingekippt. Hierbei entstand ein positiver Druck von 3 mm BRODIE. Das zweite Gefäß wurde zunächst 6 Stunden bei 40° mit Sauerstoff geschüttelt und dann wie das erste behandelt. Diesmal wurde beim Einkippen der Salzsäure keine Druckänderung beobachtet. Enthält also die Kohle gebundene Kohlensäure,

so sind diese Mengen so klein, daß sie gegen die großen Ausschlage von Hunderten von Millimetern, die bei dem Cystinversuch beobachtet werden, nicht in Betracht kommen

4. Stellen wir das Ergebnis unseres Versuchs zusammen, so ergibt sich:

	Gefunden in % der fur totale Verbrennung berechneten Menge
Sauerstoffverbrauch	32%
Kohlensäurebildung	20%
Ammoniakbildung	29%
Schwefelsäurebildung	11%

Berucksichtigen wir, daß, wie aus Abb 1 hervorgeht, die Cystinzerstorung nach 6 Stunden noch nicht vollig beendigt ist, und weiterhin, daß die Kohle einen Teil der Reaktionsprodukte moglicherweise verfestigt, so kann gleichwohl kein Zweifel bestehen, daß die Oxydation des Cystins eine unvollstandige ist; ein Schluß, der schon nach dem zeitlichen Verlauf der Sauerstoffaufnahme und bei Berucksichtigung des Endwertes der Sauerstoffaufnahme fast unabweislich war. Auch stehen die Reaktionsprodukte unter sich in einem Verhaltnis, das die Moglichkeit ausschließt, ein Teil des Cystins verbrenne vollstandig, ein anderer Teil werde durch die Kohle in unveranderter Form unwirksam gemacht Offenbar ist der Reaktionsverlauf ein komplizierterer

Es ist ein Mangel dieser Untersuchung, daß wir uber den Verbleib des Cystins nicht vollstandig Rechenschaft ablegen konnen Trotzdem haben wir geglaubt, uns in dieser Beziehung bescheiden zu mussen, da eine Entwirrung des Reaktionsverlaufs zweifellos eine schwierige praparative Aufgabe ist, die uns zu weit von unserem eigentlichen Arbeitsgebiet abfuhren wurde Wir halten es jedoch nicht fur ausgeschlossen, daß eine nahere Untersuchung des oxydativen Abbaues von Aminosauren mittels Kohle in praparativer Hinsicht manches wertvolle Ergebnis zutage fordern wird

V. Einfluß der Temperatur auf die Cystinoxydation.

Fur diese Versuche wurde mit etwa 0,01 proz , das heißt auch bei Zimmertemperatur untersattigten Losungen gearbeitet Der Sauerstoffdruck war 700 mm Hg und blieb wahrend der Versuche praktisch konstant. Da sich der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs zwischen den Versuchstemperaturen, 30 und 40°, um 13% andert, so unterscheiden sich um den gleichen Betrag auch die Sauerstoffkonzentrationen in dem gepruften Temperaturintervall. Nach Abb 1 ist bei hohen Sauerstoffdrucken eine derartige Änderung der Sauerstoffkonzentration ohne Einfluß auf den Verlauf der Oxydation, so daß bei beiden Temperaturen praktisch bei denselben Sauerstoffkonzentrationen gearbeitet wurde.

Über den Fortschritt der Oxydation bei 30 und 40° gibt Tabelle 4 und Abb. 3 Aufschluß (Anhang Nr. 7).

Tabelle 4.

0,97 mg Cystin, 200 mg Kohle, 10 ccm H_2O. Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

40°				30°			
t (Min.)	Beobachtete Druckänderung mm	Verbrauchter Sauerstoff cmm (x)	$\frac{1}{t}\ln\frac{A}{A-x}\,10^3$ $A = 300$	t (Min.)	Beobachtete Druckänderung mm	Verbrauchter Sauerstoff cmm (x)	$\frac{1}{t}\ln\frac{A}{A-x}\,10^3$ $A = 230$
42	— 67	112	11,0	46	— 30	57	6,2
70	— 98	164	11,3	70	— 47	79	6,0
92	— 113	189	10,8	102	— 65	110	6,4
130	— 133	222	10,3	131	— 80	135	6,7
170	— 147	245	9,9	171	— 97	164	7,3
220	— 159	266	9,9	215	— 110	186	7,6
254	— 166	277	10,1	252	— 119	201	8,2
∞		300				230	

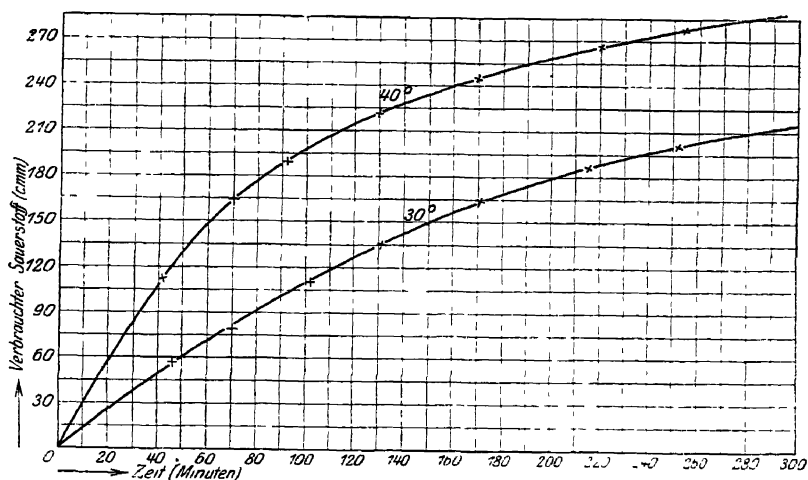



Abb. 3. 0,97 mg Cystin, 200 mg Kohle, 10 ccm H_2O. Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

Vergleichen wir zunächst die Zeiten t_{30} und t_{40}, in denen gleiche Sauerstoffmengen verbraucht werden, so finden wir (Tabelle 5) daß $\frac{t_{30}}{t_{40}}$ etwa gleich 2,5 ist, eine Tatsache, aus der nicht geschlossen werden darf, daß der „Temperaturkoeffizient" zwischen 30 und 40° gleich 2,5 ist. Wir stoßen nämlich hier auf eine ähnliche Erscheinung, wie bei Variierung der Sauerstoffdrucke, die Endwerte der Sauerstoffaufnahme sind bei verschiedenen Temperaturen verschieden. Bei 40° kommt die Oxydation zum Stillstand, wenn 300 cmm, bei 30°, wenn 230 cmm

Sauerstoff aufgenommen sind. Ähnlich also, wie die Oxydation mit steigenden Sauerstoffdrucken, so wird sie auch mit steigender Temperatur vollständiger.

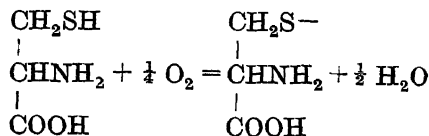
Tabelle 5.

Umsatz cmm O_2	t_{40}	t_{30}	$\frac{t_{30}}{t_{40}}$
100	37	89,5	2,42
150	61,5	150,5	2,45
200	102	250	2,45

Eine Betrachtung der dritten Stabe der Tabelle lehrt weiterhin, daß der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$ bei 30° einen ausgesprochenen Gang zeigt. Auch durch Vergleich der $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$ Werte also läßt sich nichts Sicheres darüber sagen, in welchem Maße die Temperatur die Cystinzerstörung beschleunigt.

VI. Oxydation des Cysteins an Kohle.

1. Eine wässerige Lösung von Cystein nimmt bei Zimmertemperatur Sauerstoff auf[1], die Oxydation verläuft nach der Gleichung

$$\begin{matrix} CH_2SH \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} + \tfrac{1}{4}\,O_2 = \begin{matrix} CH_2S- \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix} + \tfrac{1}{2}\,H_2O$$

Pro Mol. Cystein werden hierbei $^1/_4$ Mol Sauerstoff verbraucht.

Die Geschwindigkeit dieses Vorganges ist, wie MATHEWS und WALKER[1] in einer interessanten Arbeit gezeigt haben, von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängig, bei schwach alkalischer Reaktion besitzt sie ein ausgeprägtes Maximum.

Es scheint noch nicht festzustehen, ob ganz reine, insbesondere von jeder Spur Schwermetall befreite Cysteinlösungen sich spontan oxydieren, soviel sich aus den Angaben der Literatur ersehen läßt, wurden von verschiedenen Autoren unter sonst gleichen Bedingungen recht verschiedene Geschwindigkeiten beobachtet.

Nach unseren Beobachtungen verläuft der Vorgang im Gebiet der Wasserstoffionenkonzentration 10^{-9} am schnellsten. Wurden 6,3 mg Cysteinchlorhydrat in 10 ccm von SOERENSENS[2] Boratgemisch ($H^+ = 10^{-9,42}$)

---

[1] BAUMANN, E.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 8, 299. 1883—1884. — MATHEWS u. WALKER: Journ. of biol. chem. 6, 21. 1909. — THUNBERG, T.: Skandinav. Arch. f. Physiol. 30, 285. 1913.

[2] SOERENSEN, S. P. L.: Ergebn. d. Physiol. 12, 393. 1912.

gelöst und mit Luft bei 25° geschüttelt, so wurde folgender Gang der Sauerstoffaufnahme beobachtet:

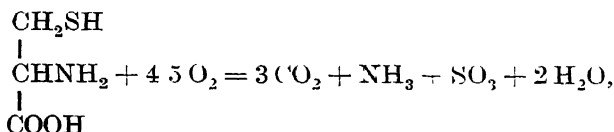
Tabelle 6.
6,3 mg Cysteinchlorhydrat, 10 ccm Boratlösung
$H^+ = 10^{-9,24}$. 25°. Luft.

t (Minuten)	Verbrauchter Sauerstoff cmm (x)	$\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x} \cdot 10^3$ ($A = 225$)
40	60	7,8
77	108	8,5
102	134	9,0
150	172	9,7
206	199	10,4
261	215	11,5
326	224	
374	225	
431	225	

Die Oxydation war also nach 6 Stunden praktisch beendigt; nach dieser Zeit waren 225 cmm Sauerstoff aufgenommen, der nach vorstehender Gleichung für 6,3 mg Chlorhydrat berechnete Wert.

Wäre die Geschwindigkeit der Oxydation der in jedem Augenblick vorhandenen Cystinmenge proportional, so müßte, da die Wasserstoffionen- und Sauerstoffkonzentration während des Versuchs als konstant betrachtet werden können, der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$ konstant sein. Die dritte Kolumne der Tabelle zeigt, daß das nicht der Fall ist; die betreffenden Werte zeigen eine Zunahme mit dem Fortschritt der Reaktion.

2. Verbrennt Cystein zu Kohlensäure, Wasser, Ammoniak und Schwefelsäure nach der Gleichung

$$\begin{array}{l} CH_2SH \\ | \\ CHNH_2 + 4{,}5\, O_2 = 3\, CO_2 + NH_3 + SO_3 + 2\, H_2O, \\ | \\ COOH \end{array}$$

so werden 4,5 Moleküle Sauerstoff verbraucht, während 3 Moleküle Kohlensäure, 1 Molekül Ammoniak und 1 Molekül Schwefelsäure entstehen. Der Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ ist für diesen Vorgang gleich 0,67.

3. Schüttelt man wässerige Cysteinlösungen, in denen Kohle suspendiert ist, bei 40° mit Sauerstoff, so wird etwa 6mal soviel Sauerstoff aufgenommen, als für den Übergang Cystein → Cystin nötig ist. Als

Endprodukte der Reaktion erscheinen Kohlensaure, Ammoniak und Schwefelsäure.

4. Was den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffaufnahme anbetrifft (Tabelle 7), so liegen die Verhaltnisse ganz ähnlich wie bei der Cystinoxydation Auch hier ist der Ausdruck $\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$ bis zur Beendigung der Sauerstoffaufnahme annahernd konstant, allerdings weniger gut als bei den Cystinversuchen (Anhang Nr 8)

Tabelle 7

6,3 mg Cysteinchlorhydrat, 200 mg Kohle, 10 ccm H_2O. 40°. Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

t (Minuten)	Beobachtete Druckanderung mm	Verbrauchter Sauerstoff cmm (x)	$\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x} \cdot 10^3$ $A = 1420$
30	—228	324	8,9
60	—396	562	8,9
90	—509	723	8,3
120	—590	838	8,1
150	—660	937	7,8
220	—773	1098	7,4
310	—866	1230	7,4
400	—935	1328	6,9
∞		1420	

5 Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Endprodukte wurde eine Losung, die auf je 100 ccm 63 mg Cysteinchlorhydrat und 2 g Kohle enthielt, bei 40° mit einer Gasmischung von 97% Sauerstoff und 3% Stickstoff geschuttelt Die Sauerstoffkonzentration konnte während der ganzen Versuchsdauer als konstant betrachtet werden Die Ablesungen und Messungen wurden nach 5—6 Stunden vorgenommen, also zu einer Zeit (vgl Tabelle 7), als die Reaktion schon nahezu beendet war

Sauerstoffverbrauch und Kohlensaurebildung In zwei ungefahr gleich große Meßgefaße (Anhang Nr 9) wurden je 10 ccm Suspension, die je 6,3 mg Cysteinchlorhydrat enthielten, eingefullt, in den Einsatz des ersten Gefaßes 1,5 ccm 5proz. Kalilauge, in den Einsatz des zweiten Gefaßes 1,5 ccm n/10-Salzsaure Dann wurde mit den Manometern verbunden und bei 40° mit der genannten Gasmischung gesattigt Nach 5 Stunden betrug die Druckanderung in dem ersten Gefaß — 699 mm Brodie, in dem zweiten Gefaß — 433 mm Brodie Daraus berechnet sich, unter Berücksichtigzng der Gefaßvolumina und der Absorptionskoeffizienten der Gase, ein Sauerstoffverbrauch von 1167 cmm und eine Kohlensaurebildung von 590 cmm Berechnet fur totale Verbrennung ist ein Sauerstoffverbrauch von 4040 cmm und eine Kohlensaurebil-

dung von 2710 cmm, das heißt, es sind 29% der berechneten Sauerstoffmenge verbraucht und 22% der berechneten Kohlensauremenge erschienen Das gefundene Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_3}$ ist 0,5, das fur totale Verbrennung berechnete 0,67.

Ammoniakbildung. 10 ccm der Suspension, die 6,3 mg Cysteinchlorhydrat enthielten, wurden mit einem Überschuß der genannten Gasmischung 5 Stunden bei 40° geschuttelt Dann wurde 1 ccm $^n/_{10}$-Salzsaure zugegeben, filtriert, mit $^n/_{10}$-Salzsaure gewaschen und in den vereinigten Filtraten das Ammoniak nach FOLIN bestimmt Erhalten 0,20 mg Ammoniak, berechnet fur totale Verbrennung 0,68 mg. Es war also 30% des Cysteinstickstoffs als Ammoniak erschienen

Schwefelsaurebildung 1240 ccm Suspension, die 781 mg Cysteinchlorhydrat enthielten, wurden 6 Stunden mit einem Überschuß der genannten Gasmischung bei 40° geschuttelt und dann weiter wie bei dem entsprechenden Cystinversuch verfahren Erhalten 214 mg Bariumsulfat, berechnet fur totale Verbrennung 1169 mg Es war also 18% des Cysteinschwefels als Schwefelsaure erschienen

Stellen wir das Resultat unseres Versuchs zusammen, so ergibt sich:

ein Sauerstoffverbrauch von 29% des fur totale Verbrennung berechneten,

eine Kohlesaurebildung von 22% der fur totale Verbrennung berechneten,

eine Ammoniakbildung von 30% der fur totale Verbrennung berechneten,

eine Schwefelsaurebildung von 18% der fur totale Verbrennung berechneten

VII. Oxydation des Tyrosins an Kohle.

Verbrennt Tyrosin vollstandig zu Kohlensaure, Wasser und Ammoniak, so werden pro Molekul Aminosaure 9,5 Molekule Sauerstoff aufgenommen und 9 Molekule Kohlensaure gebildet Das Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_2}$ ist hierbei gleich 0,95

Auch Tyrosin ist an Kohle gegenuber Sauerstoff unbestandig. Bei der Oxydation entsteht Kohlensaure, das Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_2}$ ist jedoch nicht 0,95, wie bei totaler Verbrennung, sondern 0,55 Es scheint also, daß Tyrosin ebenso wie die schwefelhaltigen Aminosauren an Kohle unvollstandig oxydiert wird.

Wir haben diesen Fall nicht genauer untersucht Von 3 Versuchen, die wir ausfuhrten, sei folgender mitgeteilt: 0,2 g natürliches, aus Seide

hergestelltes Tyrosin wurde in 200 ccm heißen Wassers gelost und zu der abgekühlten Flüssigkeit, ehe sich Aminosaure ausschied, 4 g Kohle gegeben. Je 10 ccm der so hergestellten Suspension wurden in 2 Meßgefäße eingefüllt, in den Einsatz des ersten Gefaßes außerdem 1,5 ccm 5proz. Kalilauge Dann wurde mit den Manometern verbunden und bei 40° mit einer Gasmischung von 97% Sauerstoff und 3% Stickstoff gesattigt. Beim Schütteln der Gefaße wurden die in Tabelle 8 verzeichneten Druckanderungen beobachtet (Anhang Nr. 10)

Tabelle 8

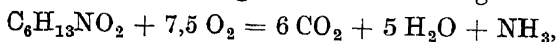
10 mg Tyrosin, 0,2 g Kohle, 10 ccm H_2O 40°, Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

t (Min.)	Sauerstoffverbrauch		Kohlensaurebildung	
	Druckanderung beobachtet	Verbraucht cmm O_2	Druckanderung beobachtet	Gebildet cmm CO_2
20	— 40	67	— 21,5	36
60	— 103	172	— 53	97
120	— 215	359	— 108	208
180	— 342	571	— 173	328
240	— 459	767	— 235	434
270	— 510	852	— 264	476
300	— 555	927	— 290	513

Nach 5 Stunden waren 927 cmm Sauerstoff verbraucht und 513 cmm Kohlensaure erschienen Es ist kaum notig, zu erwahnen, daß eine wasserige Tyrosinlosung ohne Kohle unter unseren Versuchsbedingungen gegenuber Sauerstoff bestandig ist

VIII. Oxydation des Leucins an Kohle.

Verbrennt Leucin vollstandig nach der Gleichung

$$C_6H_{13}NO_2 + 7{,}5\ O_2 = 6\ CO_2 + 5\ H_2O + NH_3,$$

so werden pro Molekul Leucin 7,5 Molekule Sauerstoff verbraucht, es entstehen 6 Molekule Kohlensaure und 1 Molekul Ammoniak Das Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_2}$ ist hierbei 0,8

Wahrend wasserige Leucinlosungen bei 40° gegenuber Sauerstoff durchaus bestandig sind, wird nach Zugabe von Kohle Sauerstoff mit großer Geschwindigkeit aufgenommen Ebenso wie die Oxydation des Cystins, so ist die Oxydation des Leucins an Kohle unvollstandig; doch geht die Desamidierung weiter, indem nach 7 Stunden, wenn die Sauerstoffaufnahme fast beendigt ist, 75% des Leucinstickstoffes als Ammoniak gefunden werden. Bemerkenswert ist auch, daß das Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_2}$ hier 0,8 ist, das heißt dasselbe wie bei totaler Verbrennung.

Das verwendete Leucin war naturliches, optisch aktives Leucin.

Über den zeitlichen Verlauf der Oxydation gibt ein in Tabelle 9 und Abb 4 wiedergegebener Versuch Aufschluß (Anhang Nr. 11)

Tabelle 9.

2,4 mg Leucin, 400 mg Kohle, mit H_2O auf 10 ccm 40°. Sauerstoffdruck 700 mm Hg.

t (Minuten)	Beobachtete Druckänderung mm	Verbrauchter Sauerstoff cmm (x)	$\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x} \cdot 10^3$ ($A = 630$)
20	— 28	49	4,1
45	— 66	115	4,6
80	—112	195	4,6
120	—154	268	4,6
165	—194	338	4,6
227	—232	404	4,6
287	—257	447	4,4
347	—277	482	4,1
407	—295	513	4,1
∞		630	

Die Sauerstoffaufnahme ist beendigt, wenn 2,4 mg Leucin 0,63 ccm Sauerstoff aufgenommen haben, das ist 20% der für totale Verbrennung berechneten Menge

Der Ausdruck

$$\frac{1}{t} \ln \frac{A}{A-x}$$

bleibt während der ganzen Dauer der Oxydation konstant, die Geschwindigkeit ist also in jedem Augenblick der Gesamtmenge an Leucin proportional Pro Minute verschwindet 0,4% der jeweils vorhandenen Leucinmenge

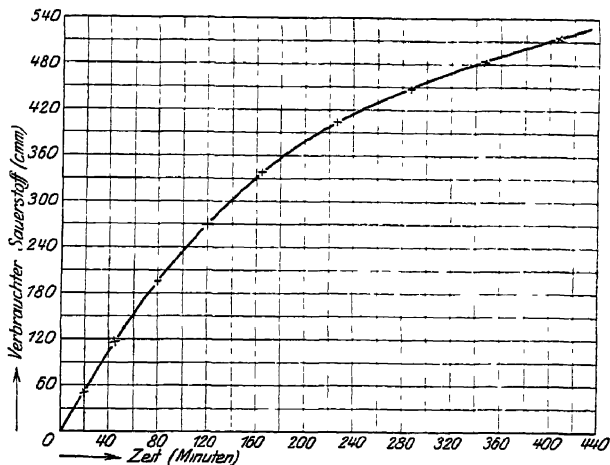



Abb 4 2,4 mg Leucin, 400 mg Kohle mit H_2O auf 10 ccm 40° Sauerstoffdruck 700 mm Hg

Zur Bestimmung der Endprodukte wurde eine Flüssigkeit hergestellt, die in 100 ccm 4 g Kohle und 24 mg Leucin enthielt In je 10 ccm wurden dann Sauerstoffverbrauch Kohlensäure- und Ammoniakbildung bestimmt, indem 7 Stunden bei 40° mit einem Überschuß von 97proz. Sauerstoff geschüttelt wurde

1 Sauerstoffverbrauch. In ein Meßgefäß wurden 10 ccm der Suspension gegeben, in den Einsatz 1 ccm 5proz Kalilauge. Die Druck-

änderung nach 410 Minuten betrug — 295 mm Brodie Unter Berucksichtigung der Gas- und Flussigkeitsvolumina (vgl Anhang Nr 12) berechnet sich daraus ein Sauerstoffverbrauch von 513 cmm

2 *Kohlensäurebildung.* In 2 Meßgefaße wurden je 10 ccm der Suspension gegeben, in die Einsätze je 1 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsaure Nachdem durch Schutteln im Thermostaten Temperatur- und Druckgleichgewicht eingetreten war, wurden die Manometerhahne beider Gefaße geschlossen und nunmehr sofort der Inhalt des einen Einsatzes in die Kohlensuspension eingekippt. Hierbei trat ein positiver Druck von 33 mm Brodie auf Unter Berücksichtigung der Gas- und Flüssigkeitsraume (vgl Anhang Nr 12) berechnet sich daraus für den Beginn des Versuchs ein Kohlensauregehalt von 68 cmm

Das zweite Meßgefaß wurde 410 Minuten geschuttelt, dann wurde, ohne zu offnen, der Inhalt des Einsatzes in die Kohlesuspension eingekippt und wenige Minuten nach dem Einkippen der Druck abgelesen, der — 89 mm Brodie betrug Daraus berechnet sich unter Berucksichtigung der Gas- und Flussigkeitsraume (vgl Anhang Nr 12) 476 cmm Kohlensaure, von der die zu Beginn des Versuchs vorhandene Menge, 68 cmm, abzuziehen ist Es waren mithin 408 cmm Kohlensaure entstanden

3. *Ammoniakbildung* 10 ccm der Suspension wurden 410 Minuten geschüttelt; dann wurde 1 ccm $^{n}/10$-Salzsaure zugegeben, filtriert, mit $^{n}/_{100}$-Salzsaure gewaschen und in den vereinigten Filtraten das Ammoniak bestimmt Erhalten 0,23 mg Ammoniak

4 Zusammenstellung des Versuchs

	Berechnet fur totale Verbrennung	Gefunden	Prozente der fur totale Verbrennung berechn Menge
Sauerstoffaufnahme .	3,1 ccm	0,51 ccm	16,5
Kohlensäurebildung	2,8 „	0,41 „	17
Ammoniakbildung	0,31 mg	0,23 mg	74

Das gefundene Verhaltnis $\frac{CO_2}{O_2}$ ist 0,8, die gleiche Zahl berechnet sich fur totale Verbrennung

IX. Anhang.

Aus den Druckanderungen, die an den Manometern beobachtet sind, ergeben sich die entstandenen oder verschwundenen Gasmengen nach folgenden Formeln (vgl. diese Zeitschr. 110, 71ff. 1920)

Sei v_M das Volumen der Manometercapillare bis zum Meniskus der Sperrflussigkeit, v_F das Volumen der flussigen, v_G das Volumen der am Ausgleich beteiligten Gasphase. alles in cmm, T die Versuchstemperatur in absoluter Zählung,

α der Absorptionskoeffizient des entstehenden oder verschwindenden Gases in der flussigen Phase bei T Grad, h die beobachtete Druckänderung in mm Brodie (10000 mm = 760 mm Hg), x die entstandene Gasmenge in cmm (0° 760 mm Hg), so ist

$$x = h\left[\frac{v_M + v_G}{v_G} - \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{10000}\right] = hK.$$

K ist die „Gefaßkonstante" Druckzunahmen werden positiv, Druckabnahmen negativ gerechnet Je nach der Natur des entstehenden oder verschwindenden Gases erhalten wir verschiedene Werte fur K, nämlich K_{O_2}, K_{CO_2} usw.

Entstehen oder verschwinden 2 Gase, so gestaltet sich die Bestimmung sehr einfach, wenn ein geeignetes Absorptionsmittel zur Verfugung steht. Handelt es sich beispielsweise um Sauerstoff und Kohlensaure, so werden 2 Meßgefaße mit gleichen Mengen der zu prufenden Substanzen beschickt. In den Einsatz des ersten Meßgefäßes (vgl. Abb 1 der oben zit Arbeit S 72) wird 5proz Kalilauge zur Absorption der Kohlensaure gegeben. Bezeichnen wir alle auf das erste Meßgefaß bezuglichen Großen mit dem Index I, alle auf das zweite Meßgefaß bezuglichen Großen mit dem Index II, so gilt

$$x_{O_2} = h^I K^I_{O_2} \quad (1)$$

$$x_{CO_2} = h^{II} K^{II}_{CO_2} - x_{O_2} \frac{K^{II}_{CO_2}}{K^{II}_{O_2}} \quad (2)$$

Sind die Gas- und Flussigkeitsraume fur beide Meßgefaße gleich, so geht (2) uber in

$$x_{CO_2} = (h^{II} - h^I)\, K_{CO_2}$$

Nr 1 10 ccm einer 2proz Kohlensuspension, die 10 mg Cystin enthielten, wurden in einem Rezipienten von 23,3 ccm Inhalt eingefullt und 30 Minuten lang bei 40° mit 99,7proz Sauerstoff gesattigt Hierauf wurden die Hahne geschlossen und bei 40° geschuttelt Barometerstand bei Schluß der Hahne 760 mm Hg, $v_F = 10$, $v_G = 13{,}3$ $K_{CO_2} = 1{,}68$ (vgl diese Zeitschr **110**, 71 1920)

Nach 2 Stunden wurde der Rezipient mit dem Meßrohr eines Haldaneapparats verbunden und ein Teil der Gasmischung eingesaugt

Analyse: Stickstoff im Apparat 1,97 ccm Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 8,39 ccm Eingesaugt 6,42 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 8,18 ccm Nach Absorption durch Hydrosulfit 2,00 ccm Gasrest 0,03 ccm. Die Zunahme des Gasrestes um 0,01 ccm lag also innerhalb der Fehlergrenzen

Nr 2. Loslichkeit des Cystins 0,2 g Cystin wurden mit 200 ccm Wasser gekocht, heiß von wenig ungelostem abfiltriert und das Filtrat im Thermostaten bei 40° geschuttelt, wobei sich Aminosaure ausschied Nach 1, 3 und 6 Stunden wurde eine Probe abfiltriert und der Prozentgehalt an Cystin in den Filtraten polarimetrisch bestimmt

Zur polarimetrischen Bestimmung wurde mit $^1/_{10}$ Volumen 10fach normal Salzsaure versetzt und α_D im 2-Dezimeterrohr gemessen (Fehler einer polarimetrischen Bestimmung 0,005°) Setzt man fur $[\alpha]_D$ den Wert von −216° (vgl Abschnitt I), so berechnet sich die Cystinmenge P, die auf 100 ccm Filtrat kommt, zu

$$P = \frac{\alpha_D \cdot 100}{[\alpha]_D\ 2}\ 1{,}1$$

α_D nach einstundigem Schütteln −0,20°.
α_D nach dreistundigem Schutteln. −0,14°
α_D nach sechsstundigem Schutteln −0,14°

In Gegenwart des Bodenkorpers hatte sich also nach dreistundigem Schutteln das Gleichgewicht eingestellt, die Losung enthielt dann auf 100 ccm 0,036 g Cystin.

Nr. 3 Bindung des Cystins. Polarimetrische Bestimmungen im 2-Dezimeterrohr nach Zugabe von $^1/_{10}$ Volum 10fach normal Salzsaure, Berechnung von P aus α_D nach der Formel in Nr 2

a) Stammlosung $\alpha_D = -0{,}135^0$ P = 0,034

b) 100 ccm Stammlosung mit 1 g Kohle 0,5 Minuten bei 40^0 geschuttelt Filtrat $\alpha_D = -0{,}055^0$ P = 0,014.

c) 100 ccm Stammlosung mit 1 g Kohle 3 Minuten bei 40^0 geschuttelt Filtrat $\alpha_D = -0{,}055^0$ P = 0,014.

1 g Kohle hatte also 0,020 g Cystin = $\frac{0{,}02 \cdot 1000}{240}$ Millimole = 0,083 Millimole gebunden; die Gleichgewichtskonzentration in der Losung betrug

$$\frac{0.14}{240} = 0{,}58 \cdot 10^{-3} \text{ Mole pro Liter.}$$

Nr. 4. Glas I (97% O_2) $v_F = 3{,}0$ $v_G = 26{,}3$ $K_{O_2} = 2{,}3$
Glas II (63% O_2) $v_F = 3{,}0$ $v_G = 27{,}4$ $K_{O_2} = 2{,}39$
Glas III (20,9% O_2) $v_F = 3{,}0$ $v_G = 27{,}7$ $K_{O_2} = 2{,}42$
Glas IV (5,1% O_2) $v_F = 3{,}0$ $v_G = 27{,}8$ $K_{O_2} = 2{,}43$.

Nr 5. Im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge $v_F = 11{,}5$, $v_G = 19{,}2$, $K_{O_2} = 1{,}69$.

Nr 6. Glas I (im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_M = 1{,}3$; $v_F = 11{,}5$; $v_G = 17{,}9$; $K_{O_2} = 1{,}69$
Glas II (Einsatz leer) $v_M = 1{,}0$; $v_F = 10{,}0$; $v_G = 19{,}8$, $K_{CO_2} = 2{,}35$; $\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} = 1{,}29$.

Nr 7. Fur 40^0. (Im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_F = 11{,}5$, $v_G = 18{,}9$; $K_{O_2} = 1{,}67$
Fur 30^0. (Im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_F = 11{,}5$, $v_G = 19{,}2$; $K_{O_2} = 1{,}69$

Nr. 8 (Im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_F = 11{,}5$, $v_G = 16$, $K_{O_2} = 1{,}42$

Nr 9. Glas I (im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_M = 1{,}2$; $v_F = 11{,}5$, $v_G = 17{,}7$; $K_{O_2} = 1{,}67$.
Glas II (im Einsatz 1,5 ccm $^1/_{10}$ n-HCl) $v_M = 1{,}3$, $v_F = 11{,}5$, $v_G = 17{,}9$, $K_{CO_2} = 2{,}31$, $\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} = 1{,}36$

Nr 10 Glas I (im Einsatz 1,5 ccm 5proz Kalilauge) $v_F = 11{,}5$, $v_G = 18{,}9$, $K_{O_2} = 1{,}67$.
Glas II (Einsatz leer) $v_M = 1{,}3$, $v_F = 10$, $v_G = 19{,}4$; $K_{CO_2} = 2{,}36$; $\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} = 1{,}29$.

Nr 11 Im Einsatz 1,0 ccm 5proz. Kalilauge;
$v_F = 11{,}0$; $v_G = 19{,}7$; $K_{O_2} = 1{,}74$

Nr 12 Sauerstoffverbrauch Im Einsatz 1 ccm 5proz. Kalilauge;
$v_F = 11{,}0$; $v_G = 19{,}7$; $K_{O_2} = 1{,}74$

Kohlensaurebildung: (in den Einsätzen je 1 ccm $^n/_{10}$-n-HCl)
Erstes Gefäß: $v_M = 0{,}9$; $v_F = 11$; $v_G = 15{,}6$, $K_{CO_2} = 2{,}05$.
Zweites Gefäß: $v_M = 1{,}0$, $v_F = 11$; $v_G = 18{,}7$, $K_{CO_2} = 2{,}31$.
$\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} = 1{,}33$.

Biochem Zeitschr 119, 134. 1921.

Physikalische Chemie der Zellatmung[1].

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 18. April 1921.)

Mit 1 Abbildung.

Die vorliegende Abhandlung zerfallt in folgende Abschnitte:

Fragestellung.

Eiweiß ist bei Korpertemperatur gegenuber Sauerstoff von Atmospharendruck bestandig Wasserige Eiweißlosungen konnen bei Luftzutritt jahrelang unverandert aufbewahrt werden, wenn man fur Fernhaltung lebender Keime Sorge tragt Thermodynamisch betrachtet, haben wir hier „falsche Gleichgewichte" vor uns, es bedarf keiner Zufuhr von Arbeit, um Eiweiß mit Sauerstoff in Reaktion zu bringen, sondern, wie man sich ausdruckt, der Beseitigung von Reaktionswiderstanden

Auch in der lebenden, mit Sauerstoff durchtrankten Zelle ist die Hauptmasse der Zellsubstanz mit Sauerstoff in falschem Gleichgewicht d h. gegenuber Sauerstoff ebenso bestandig wie im Reagensglas Ware dem nicht so, wurde die organische Welt nicht existieren Nur an einzelnen Stellen werden, nach Maßgabe des Energiebedarfs der Zelle, jene Reaktionswiderstande verkleinert. hier an den Verbrennungsorten, wird der Kohlenstoff des Eiweißmolekuls zu Kohlensaure, sein Wasserstoff zu Wasser, sein Schwefel zu Schwefelsaure oxydiert Dies ist der Vorgang, den wir als Sauerstoffatmung bezeichnen, und die Frage, die wir stellen, lautet Welcher Mittel bedient sich die Zelle, um an den Verbrennungsorten die tragen organischen Verbindungen mit Sauerstoff in Reaktion zu bringen?

[1] Auszugsweise veroffentlicht in „Festschrift der Kaiser-Wilhelmgesellschaft". Berlin: Julius Springer, 1921.

I. Versuche an Zellen.

Die Verbrennungsorte[1]

Bringt man rote Vogelblutzellen in eine Kältemischung von — 80°, so zerreißen beim Gefrieren die feinen die Strukturteile umhüllenden Membranen und man erhält beim Auftauen eine Flüssigkeit, in der die festen Zellbestandteile frei schweben. Der Versuch läßt sich so anordnen, daß die Atmung nach dem Auftauen für einige Stunden unverändert bleibt.

Zentrifugiert man nach dem Auftauen, so erhält man 2 Schichten: eine obere, klare, von den festen Zellbestandteilen befreite, und eine tiefere, trübe, die festen Zellbestandteile enthaltende. Mißt man in den so getrennten Schichten die Atmung, so findet sich, daß nur die tiefere Schicht atmet. Die gesamte Atmung ist an die festen Zellbestandteile gebunden.

In allen Fällen, in denen bisher eine Zerstörung der Zelle ohne gleichzeitige Vernichtung der Atmung gelang, beobachtet man ähnliches. So ist die Atmung des unbefruchteten Seeigeleis, die Atmung der Leberzellen höherer Tiere großtenteils an feste Partikel gebunden, die man als intracellulare Granula bezeichnet. Je kleiner die festen Partikel, um so schwerer ist ihre Entfernung aus dem flüssigen Zellinhalt. Die festen Partikel der roten Blutzellen, die als große „Schatten“ zusammenhängen, lassen sich leicht durch Zentrifugieren herausschleudern. Die festen Partikel der Leberzellen können nach dem gleichen Verfahren nicht vollständig abgetrennt werden, auch nach langem Zentrifugieren sind hier die überstehenden Flüssigkeiten nicht frei von Atmung, und selbst die Filtration durch engmaschige Kieselgurkerzen liefert noch atmende Filtrate. Die Atmung in derartigen Filtraten, die frei von groberen Partikeln sind, entspricht der Gärung in BUCHNERs Hefepreßsaft. Wie die Wirkung im Hefepreßsaft, so mag man die Wirkung in den Leberzellenfiltraten als „enzymatisch“ bezeichnen. Doch muß man bedenken, daß mit dieser Ausdrucksweise für die Lösung unserer Frage nichts gewonnen ist.

Wirkung der Narkotica auf die Atmung[2]

Es gibt eine große Anzahl zellfremder Stoffe, mittels deren sich die Atmung ohne Schädigung der Zelle hemmen läßt. Entfernen wir einen derartigen Stoff nach nicht allzu langer Einwirkung wieder aus aus der Zelle, so steigt die Atmung auf ihre normale Höhe.

Wir wollen uns im folgenden nur mit solchen Stoffen beschäftigen,

[1] WARBURG, O. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 413. 1911; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **154**, 599. 1913; **158**, 189. 1914.

[2] WARBURG, O. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 452. 1910; Ergebn. d. Physiol. **14**, 253. 1914.

die schnell in lebende Zellen eindringen, und scheiden damit die komplizierende Frage aus, wieweit eine beobachtete Wirkung mit der Eintrittsgeschwindigkeit in die Zelle zusammenhangt Losen wir einen unserer Stoffe bis zur Konzentration c in der die Zelle umspulenden Flussigkeit, so befinden sich alle Phasen des Zellinnern mit c im Verteilungsgleichgewicht.

Vergleichen wir die Konzentrationen verschiedener Stoffe, die die Atmung um den gleichen Betrag hemmen, so finden wir in einigen Fallen gleiche Wirkungen bei gleichen Konzentrationen. Beispielsweise wird die Atmung roter Vogelblutzellen durch eine $^n/_{100}$-Losung von Acetaldehyd, Propylaldehyd, Butyraldehyd oder Valeraldehyd um etwa 50% gehemmt. Wir schließen daraus, daß die Wirkung dieser Stoffe durch ihre im chemischen Sinn reaktionsfahige Gruppe, die Aldehydgruppe, bestimmt wird

Andere zellfremde Stoffe — die Narkotica — wirken auf die Atmung nicht durch ihre im chemischen Sinn reaktionsfahigen Gruppen. Vergleicht man die Wirkung verschiedener Alkohole, Urethane, Ketone, Nitrile, so findet man innerhalb einer Korperklasse nicht gleiche Wirkungen bei gleichen Konzentrationen, sondern die Wirkungsstarken der Alkohole unter sich, der Urethane unter sich, liegen um das Hundert- bis Tausendfache auseinander (Tabelle 1)

Tabelle 1.

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter	Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter
Methylakohol	5,0	Aceton .	0,9
Äthylalkohol	1,6	Methylpropylketon	0,17
Propylalkohol	0,8	Methylphenylketon	0,014
Butylalkohol	0,15		
Amylalkohol	0,045	Acetonitril	0,85
Methylurethan	13	Propionitril	0,36
Äthylurethan	0,33	Valeronitril	0,06
Propylurethan	0,13	Dimethylharnstoff	1,4
Butylurethan	0 043	Diäthylharnstoff	0,52
Phenylurethan	0,003	Phenylharnstoff	0,018
Methylal	0,6	Vanillin	0,02
Acetal.	0,14	Thymol	0,0007

Setzt man dieselben Stoffe zu einem garenden Hefepreßsaft, so wird die Vergarung des Zuckers bei hoheren Konzentrationen, jedoch in der gleichen Reihenfolge gehemmt wie die Zellatmung Hier beobachtet man mit der Wirkung eine Veranderung des Preßsaftes[1], indem immer

[1] WARBURG, O. u. WIESEL Pflugers Arch f. d ges. Physiol. 144, 465. 1912. — MEYERHOF, O.: Pflugers Arch. f d. ges. Physiol. 157, 251 1914; 157, 307. 1914 —

dann, wenn eine Hemmung erfolgt, die Kolloide ausflocken Die Wirkung ist also eine capillarchemische, Flockung bedeutet Grenzflächenveränderung der Kolloide

Nach derselben Richtung weist eine Übereinstimmung, die J TRAUBE[1] bei Betrachtung unserer Tabelle 1 auffiel Die wasserigen Losungen der dort aufgefuhrten Stoffe zeigen durchweg gegenuber Luft eine niedrigere Oberflachenspannung als reines Wasser, und zwar ist diese Erniedrigung für gleich wirksame Losungen vielfach gleich groß

Indessen gilt der Satz, daß „isocapillare" Losungen gleich wirksam sind, nur dann, wenn man die Losungen sehr ähnlicher Stoffe vergleicht, wie beispielsweise die Reihe der homologen aliphathischen Alkohole, jedoch nicht angenahert, wenn man die Losungen verschiedenartiger Stoffe vergleicht. Zum Beleg seien einige Messungen wiedergegeben (Tabelle 2 und 3), in denen wir fur gleich wirksame Konzentrationen verschiedener Stoffe die Capillarkonstanten ermittelt haben. σ_W in den Tabellen bedeutet die Capillarkonstante des reinen Wassers, σ_L die Capillarkonstante der Lösung bei der Konzentration c des Narkoticums. c hemmt in allen Fallen die Zellatmung um 50%

Tabelle 2. *Alkoholreihe.*

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter (c)	$\frac{\sigma_W - \sigma_L}{\sigma_W}$ 100
Methylalkohol	5,0	31
Äthylalkohol	1,6	28
Propylalkohol	0,8	35
Butylalkohol	0,15	28
Amylalkohol	0,045	28

Tabelle 3. *Mischreihe*

Substanz	Atmungshemmung um 50% durch Mole pro Liter (c)	$\frac{\sigma_W - \sigma_L}{\sigma_W}$ 100
Diäthylharnstoff (symm)	0,52	18,8
Amylalkohol (Gärungs-)	0,045	28,0
Methylphenylketon	0,014	7,7
Phenylurethan	0,003	4,5
Thymol	0,0007	8,3

Wie man sieht, findet man fur die Mischreihe sehr verschiedene Capillardepressionen. Andererseits ist die Konstanz in der Alkohol-

FREUNDLICH, H. u RONA diese Zeitschr 81, 87. 1917. — MEYERHOF, O: diese Zeitschr. 86, 325. 1918

[1] TRAUBE, J.: Pflugers Arch f. d. ges Physiol. 153, 276. 1913

reihe auffallend, sie wird von J. TRAUBE[1] folgendermaßen erklärt. Ein Stoff dringt um so schneller in die Zelle ein, je stärker er die Oberflächenspannung der umspülenden Lösung erniedrigt. Er wirkt um so stärker, je schneller er eindringt. Isocapillare Lösungen verschiedener Narkotica wirken gleich, weil aus ihnen in der Zeiteinheit gleiche Mengen Narkoticum in die Zelle eindringen.

Diese Theorie ist nicht haltbar. Insbesondere übersieht TRAUBE, daß die Wirkungsstärken unserer Stoffe im Verteilungsgleichgewicht gemessen sind, daß also Verschiedenheiten der Wirkungsstärken nicht durch Verschiedenheiten der Eintrittsgeschwindigkeiten erklärt werden können.

Wir werden später auf den Zusammenhang zwischen Grenzflächenspannung und Wirkungsstärke zurückkommen.

Adsorption der Narkotica in lebenden Zellen[2]

Fügen wir zu roten Vogelblutzellen, die in einer Kochsalzlösung aufgeschwemmt sind, Thymol und messen im Gleichgewicht die Verteilung des Thymols zwischen der lebenden Zelle und der umspülenden Salzlösung, so finden wir, ziemlich unabhängig von der Konzentration, einen Verteilungskoeffizienten von 7, d. h. 1 Volumen Zellen enthält im Gleichgewicht ca. 7 mal soviel Thymol als 1 Volumen der umspülenden Salzlösung. Bei gleicher Versuchsanordnung erhalten wir kleinere Verteilungskoeffizienten für die übrigen Stoffe der Tabelle 3. Die Reihe, geordnet nach der Größe der Verteilungskoeffizienten lautet: Diäthylharnstoff < Amylalkohol < Methylphenylketon < Phenylurethan < Thymol, die Folge entspricht ohne Ausnahme der der Wirkungsstärken. Je stärker die Wirkung, um so größer ist also bei gleicher Außenkonzentration die Anreicherung in der Zelle.

Indem man das Bindungsvermögen der flüssigen und der festen Zellbestandteile getrennt bestimmt, kann man zeigen, daß die Anreicherung vorwiegend durch die festen Zellbestandteile erfolgt. Auf gleiche Gewichtsmengen umgerechnet, binden die festen Zellbestandteile etwa 10 mal soviel Thymol als die flüssigen.

Die Bindung ist als Adsorption aufzufassen. Isoliert man die festen Zellbestandteile und kocht sie mit Alkohol und Äther aus — um Körper, die als Lösungsmittel wirken könnten, zu entfernen —, so bleibt das Bindungsvermögen gegenüber Thymol unverändert. Die festen Struk-

[1] Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. l. c.

[2] WARBURG, O. u. USUI: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 175. 1912. — DORNER: Sitzungsber. d. Heidelberg. Akad. d. Wiss. Mathem.-naturw. Kl. 1914, S. 2. Ergebn. d. Physiol. 14, 253. 1914.

turteile adsorbieren also chemisch indifferente Stoffe in ähnlicher Weise wie Kohle. 2 Zahlenbeispiele seien angeführt:

Substanz	Konzentration in der Lösung Mole pro Liter	Adsorbierte Menge Millimole pro Gramm
n-Oktylalkohol . .	$2{,}2 \cdot 10^{-3}$	0,06
Thymol . . .	$1{,}5 \cdot 10^{-3}$	0,09

Bezogen auf gleiche Gewichtsmengen Adsorbens, ist das Adsorptionsvermögen der festen Zellbestandteile kleiner als das hochwertiger Kohlen, doch besagt dieser Vergleich nicht viel, da in beiden Fällen die Größen der wirksamen Oberflächen nicht bekannt sind.

Eisen als Sauerstoffüberträger in der Zelle[1].

Nach dem Vorhergehenden hemmt ein Narkoticum die Zellatmung in um so kleinerer Konzentration, je stärker es von den festen Zellbestandteilen adsorbiert wird. Die Wirkungsstärken wachsen nach Maßgabe der Adsorptionskonstanten.

Blausäure hemmt die Atmung der meisten Zellen bei Konzentrationen von etwa $^1/_{10000}$ Mol pro Liter und ist damit, hinsichtlich der Beeinflussung der Atmung, der wirksamste Stoff, den wir kennen. Doch ergibt die Messung der Adsorption eine sehr kleine Konstante, etwa von der Größe des zehntausendmal unwirksameren Acetons. Die Wirkungsweise der Blausäure ist also eine andere als die der Narkotica[2] und es liegt nahe, hier an eine Umsetzung mit einem in kleiner Menge vorhandenen, für die Atmung wichtigen Zellbestandteil zu denken. In der Tat haben Versuche am Seeigelei diese Auffassung sehr wahrscheinlich gemacht.

Das Seeigelei enthält eine kleine Menge Eisen, etwa 0,03 mg pro Gramm Trockensubstanz. Die Form, in der das Eisen vorliegt, ist nicht näher bekannt, ist es organisch gebunden, so ist die Bindung eine sehr lockere, da bei Zusatz von Eisenionreagenzien sofort die bekannten Reaktionen auftreten. — Gibt man Stoffe zu der Zellsubstanz, deren Oxydation im Reagensglas durch Eisensalz beschleunigt wird, so beobachtet man unter gewissen Bedingungen die nach dem Eisengehalt zu erwartenden Oxydationsbeschleunigungen. — Verdoppelt man den natürlichen Eisengehalt der Zellsubstanz, so steigt die Atmung auf etwa den doppelten Betrag. Andere Schwermetalle, z. B. Kupfer und Mangan, sind ohne Wirkung, ebenso Eisenzusätze, die im Vergleich zum natürlichen Eisengehalt der Zelle klein sind.

Bekanntlich besitzt Blausäure eine besondere Verwandtschaft zu Schwermetallen und es liegt nahe, ihre Wirkung auf die Atmung mit

[1] Warburg, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **92**, 231. 1914.
[2] Warburg, O.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **76**, 331. 1911.

dieser Verwandtschaft in Beziehung zu bringen Der Eisengehalt einer Zelle und die zur Atmungshemmung nötige Blausäuremenge sollten dann, der Größenordnung nach, übereinstimmen. In der Tat genügen einige hundertstel Milligramme Blausäure pro Gramm Zellsubstanz, um die Atmung des Seeigeleis völlig zu hemmen, das heißt, die dem Eisengehalt entsprechende Menge.

II. Modellversuche.

Reaktionsgeschwindigkeit an Oberflächen

Nach einer Entdeckung von Dulong und Thénard[1] haben feste Körper die Eigenschaft, Gasreaktionen zu beschleunigen So erhöhen Quarz, Bernstein, Porzellan, Kohle und viele andere Körper die Geschwindigkeit, mit der sich Wasserstoff und Sauerstoff vereinigen. Bald nach Dulong und Thénard beschäftigte sich Faraday[2] eingehend mit dem Phänomen und sprach die Vermutung aus, daß die Gase an der Oberfläche der festen Körper verdichtet und im wesentlichen infolge dieser Verdichtung reaktionsfähiger würden[3]

Seit Faradays Zeiten ist eine große Anzahl ähnlicher Reaktionen beobachtet und näher untersucht worden, und es ist bekannt, welche Rolle die Beschleunigung von Gasreaktionen durch feste Körper in der Technik spielt Viel seltener sind Fälle gefunden, in denen die Adsorption aus Lösungen Reaktionsbeschleunigungen bedingt; infolge der Konkurrenz mit dem Lösungsmittel werden offenbar gelöste Stoffe aus Lösungen bei weitem nicht so stark adsorbiert, wie Gase aus Gasräumen. Doch haben naturgemäß nur Adsorptionen aus wässerigen Lösungen und durch sie bedingte Reaktionsbeschleunigungen biologisches Interesse

Gibt man zu einer wässerigen Kohlesuspension organische Stoffe, die adsorbiert werden, und schüttelt bei Zimmertemperatur mit Luft, so kann mittels empfindlicher Methoden in vielen Fällen eine Oxydation der organischen Substanz nachgewiesen werden. Doch sind die Geschwindigkeiten im allgemeinen so klein, daß im Laufe einiger Tage nur wenige Prozente der adsorbierten Substanz oxydiert werden Hierzu stimmt es, daß im allgemeinen die Messung der Adsorptionsgleichgewichte durch chemische Veränderung der adsorbierten Stoffe nicht gestört wurde

[1] Ann. de chim et de physique 24, 380 1823.

[2] Experimental Researches VI Reihe 1834. Übersetzt in Ostwalds Klassiker, Nr. 87.

[3] Die Ähnlichkeit des Phänomens mit gewissen Fermentwirkungen wurde schon frühzeitig, so von Berzelius, von Schönbein, erkannt Insbesondere sei hier auf die bekannten Untersuchungen Bredigs und seiner Schule über „Anorganische Fermente“ hingewiesen (Zeitschr. f. physikal. Chem. **31**, 258. 1898; **37**, 323 u. 448 1901; **66**, 162 1909; **70**, 34 1909; **72**, 641 1910; **81**, 385. 1912).

Doch trifft dies nicht immer zu, wir kennen Falle, in denen die Oxydation einiger Prozente der adsorbierten Substanz nicht Tage, sondern Minuten dauert. Von diesen Fällen wollen wir 2 naher besprechen, die Verbrennung der Oxalsaure und die Verbrennung der Aminosauren.

Verbrennung der Oxalsaure an Blutkohle

Schüttelt man eine wasserige Oxalsäurelosung mit Blutkohle, so folgt auf eine erste schnelle Konzentrationsabnahme der Oxalsäure eine zweite langsamere[1] Durch diese Beobachtung FREUNDLICHS angeregt, haben wir das Verhalten der an Kohle adsorbierten Oxalsaure gegenuber Sauerstoff untersucht und gefunden[2], daß sie bei Zimmertemperatur und dem Sauerstoffdruck der Luft schnell zu Kohlensaure und Wasser verbrennt

Diese Oberflachenoxydation wird durch Narkotica in ahnlicher Weise gehemmt wie die Zellatmung; gleiche Hemmung tritt nicht ein bei gleicher Konzentration in der Losung, sondern die Wirkungsstarken steigen nach Maßgabe der Adsorptionskonstanten (Tab. 4) Hier ist der Zusammenhang ohne weiteres einleuchtend, maßgebend ist die Konzentration der hemmenden Stoffe am Orte der Wirkung

Tabelle 4

Oxalsaure-Kohle

Substanz	Gewichtsprozente in der Losung	Prozentische Oxydationshemmung
Methylurethan	0,05	0
	0,5	34
	5,0	46
	10,0	60
Äthylurethan	0,5	42
	5,0	65
	10,0	76
Propylurethan	0,05	41
	0,5	72
	5,0	92
Phenylurethan	0,005	34
	0,05	90

Rote Blutzellen

Substanz	Gewichtsprozente in der Losung	Prozentische Oxydationshemmung
Methylurethan	10	ca 60
Äthylurethan	1,25	14
	2,5	22
	5,0	88
Propylurethan	1,0	44
	2,0	94
Phenylurethan	0,025	33
	0,05	55
	0,1	90

Die Gegenuberstellung der Wirkung der Urethane auf Zellatmung und Modellatmung in Tabelle 4 zeigt, wie gut sich das Modell zur Nachahmung der Atmungshemmungen eignet. Was dagegen den verbrennenden Stoff selbst betrifft, so handelt es sich hier offenbar nicht um eine

[1] FREUNDLICH, H : Capillarchemie, S. 163ff. Leipzig 1911

[2] WARBURG, O Pflugers Arch f. d ges Physiol **155**, 547. 1914.

Reaktionsbeschleunigung von der Größenordnung, wie wir sie in der Atmung beobachten; denn Oxalsäure ist auch in wässeriger Lösung relativ unbeständig. Interessanter ist in dieser Hinsicht unser zweiter Fall, das Aminosäuremodell.

Verbrennung der Aminosäuren an Blutkohle[1]

Gibt man zu einer wässerigen Cystinlösung Kohle und schüttelt bei Zimmertemperatur mit Luft, so verschwindet die Aminosäure unter Sauerstoffaufnahme, während gleichzeitig Kohlensäure, Ammoniak und Schwefelsäure als Endprodukte auftreten, das heißt, die Endprodukte der Eiweißverbrennung in lebenden Zellen. Ähnlich verbrennen andere Aminosäuren, beispielsweise Leucin und Tyrosin. Beachtenswert ist hierbei, daß der Stickstoff der Aminosäuren nicht, wie bei der Verbrennung in der BERTHELOTschen Bombe, mitoxydiert, sondern, wie von der lebenden Zelle, als Ammoniak abgespalten wird.

Mit Hinblick auf unser Thema wollen wir fragen, wie groß die Wirksamkeit der Kohle als Oxydationskatalysator ist im Vergleich zur Wirksamkeit lebenden Gewebes. Vergleichen wir mit einem besonders stark atmenden Gewebe, der Warmbluterleber, so findet sich, daß 1 g Kohle, im Gleichgewicht mit einer $^{n}/_{500}$-Cystinlösung, in einer bestimmten Zeit ebensoviel Sauerstoff verbraucht wie die gleiche Gewichtsmenge lebenden Gewebes. Hier handelt es sich also erstens um Geschwindigkeiten und zweitens um Beschleunigungen, wie wir sie in der Zellatmung beobachten. Denn bekanntlich gehören die Aminosäuren zu den beständigsten Körpern der organischen Chemie und reagieren selbst im Lauf von Jahren nicht merklich mit Luftsauerstoff. Andererseits übertreffen sie in der lebenden Zelle alle anderen Stoffe an Unbeständigkeit.

Auch diese Oberflächenoxydation[2] wird durch Narkotica in ähnlicher Weise gehemmt wie die Zellatmung. Gibt man zu gleichen Mengen Kohle und Aminosäurelösung so viel verschiedener Narkotica, daß die Oxydationsgeschwindigkeit immer um denselben Betrag sinkt und mißt in diesem Zustand gleicher Hemmung die Narkoticumkonzentrationen c in der Lösung, so findet man (Tabelle 5), daß sich die c-Werte für chemisch ähnliche Narkotica um das Hundert- bis Tausendfache unterscheiden.

Wirkung der Narkotica[2]

Bei konstantem Sauerstoffdruck ist die Geschwindigkeit, mit der eine Aminosäure an der Kohleoberfläche oxydiert wird, ihrer in jedem

[1] WARBURG, O. u. NEGELEIN, diese Zeitschr. **113**, 257. 1921.
[2] Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Tabelle 5. *Hemmung der Cystinoxydation.*

Substanz	c
Dimethylharnstoff (asym.)	0,03
Diäthylharnstoff (sym.)	0,002
Phenylharnstoff	0,0002
Acetamid	0,2
Valeramid	0,003
Aceton	0,07
Methylphenylketon	< 0,0004
Äthylalkohol	0,32
Amylalkohol	0,0015
Acetonitril	0,2
Valeronitril	0,0021

Augenblick adsorbierten Menge proportional. Entfernen wir also bei einer gegebenen Anordnung die Hälfte der Aminosäure von der Kohle, so sinkt die Oxydationsgeschwindigkeit auf die Hälfte.

Adsorptionsmessungen zeigen, daß aus einem Gemisch von Aminosäure und Narkoticum weniger Aminosäure adsorbiert wird als aus einer reinen Aminosäurelösung. Lassen wir Cystin zunächst aus einer reinen Aminosäurelösung adsorbieren und fügen nunmehr ein Narkoticum hinzu, so verdrängt[1] das Narkoticum die Aminosäure von der Kohleoberfläche.

Narkoticumkonzentrationen, die nicht merklich verdrängen, bewirken keine merkliche Hemmung der Oxydation. Bestimmt man für verschiedene Narkotica einerseits den Grad der Adsorptionsverdrängung, andererseits den Grad der Oxydationshemmung, so findet man eine sehr weitgehende Übereinstimmung beider Größen. Es ist daraus zu schließen, daß die Verdrängung der einzige Grund der Oxydationshemmung ist, indem der nichtverdrängte Rest der Aminosäure, unbeeinflußt durch die Gegenwart des Narkoticums, verbrennt.

Mit der Verdrängung der Aminosäure kommt ihre Oxydation, wie ohne weiteres anschaulich ist, zum Stillstand. Das gleiche gilt für die Sauerstoffaufnahme nur dann, wenn der verdrängende Stoff nicht seinerseits an der Kohleoberfläche oxydiert wird. Da die meisten Narkotica auch im Zustande der Adsorption gegenüber Sauerstoff relativ beständig sind, so bedingt die Verdrängung einer Aminosäure in der Regel auch einen Stillstand der Sauerstoffaufnahme.

[1] Die Erscheinung der Adsorptionsverdrängung in wässerigen Lösungen wurde zuerst beobachtet von FREUNDLICH und MASIUS für das Stoffpaar Oxalsäure-Bernsteinsäure (MASIUS, Diss. Leipzig 1908) und von MICHAELIS und RONA für das Stoffpaar Aceton-Essigsäure (diese Zeitschr. 15, 196. 1908). Vgl. auch FREUNDLICH u. MASIUS, Gedenkbuch für van Bemmelen, S. 88. 1910.

Theorie der Narkoticawirkung.

Gibt man zu gleichen Mengen Kohle und Aminosaurelosung so viel verschiedener Narkotica, daß immer dieselbe Menge Aminosaure verdrangt wird, und mißt im Zustande gleicher Verdrangung einerseits die Narkoticumkonzentrationen c in der Losung, andererseits die von der Gewichtseinheit Kohle adsorbierten Narkoticummengen x, so findet man die Unterschiede der x-Werte, im Vergleich zu den Unterschieden der c-Werte, relativ klein[1] Beispielsweise hat 1 g Kohle, wenn 0,03 Millimole Cystin verdrangt sind, 0,6—1,5 Millimole der verschiedenen Narkotica adsorbiert, bei um das Tausendfache verschiedenen Narkoticumkonzentrationen in der Lösung (Tabelle 6, Spalte 2 u. 3).

Tabelle 6.

Spalte 1 Substanz	Spalte 2 c (Mole pro Liter Losung)	Spalte 3 x (Millimole pro Gramm Kohle)	Spalte 4 $x \cdot (V_m)^{\frac{2}{3}}$
Dimethylharnstoff (asym.)	0,03	1,1	9,0
Diathylharnstoff (sym.)	0,002	0,68	6,9
Phenylharnstoff	0,0002	0,76	8,7
Acetamid	0,17	1,2	7,3
Valeramid	0,003	0,62	6,9
Aceton	0,073	1,33	8,3
Methylphenylketon	$<$ 0,0004	0,73	8,0
Amylalkohol	0,0015	0,87	7,9
Acetonitril	0,2	1,5	7,7

Wir machen nunmehr die folgenden in jeder Hinsicht einfachsten Annahmen: Der verdrangende Stoff soll die Kohleoberflache in einer einzigen Lage von Molekulen besetzen, die so bewirkte Verkleinerung der freien Oberflache die alleinige Ursache der Verdrangung sein Dann ist die Wirkung unabhängig von der chemischen Natur des adsorbierten Narkoticums und bestimmt durch die Zahl x der adsorbierten Molekule einerseits, der von jedem Molekul beanspruchten Flache F andererseits Die Bedingung fur gleiche Wirkung lautet also

$$x \cdot F = K.$$

x, die Zahl der adsorbierten Molekule, kann gemessen werden F, die von einem Molekul beanspruchte Flache, ist gleich der Wand des Würfels, den das kugelförmig gedachte Molekul erfullt Bezeichnen wir mit V_m das aus den Refraktionsaquivalenten berechnete Molekular-

[1] Experimenteller Teil dieser Abhandlung

volumen[1], so ist F proportional $(V_m)^{\frac{2}{3}}$ oder die Bedingung für gleiche Wirkung

$$x \cdot (V_m)^{\frac{2}{3}} = K \qquad (1)$$

Die vierte Spalte der Tabelle 6 zeigt, daß diese Bedingung mit großer Annäherung erfüllt ist

Nach FREUNDLICH[2] besteht zwischen der adsorbierten Menge x eines Stoffes und seiner Konzentration c in der Lösung die Beziehung

$$x = k\,c^{\frac{1}{n}}, \qquad (2)$$

worin k und n Konstanten bedeuten Setzen wir den Wert für x aus (2) in (1) ein, so ergibt sich die Beziehung

$$k\,c^{\frac{1}{n}} \cdot (V_m)^{\frac{2}{3}} = K \qquad (3)$$

Aus dieser Gleichung kann die Wirkungsstärke c für ein beliebiges Narkoticum berechnet werden, wenn K, die Adsorptionskonstanten und die Molekularvolumina gegeben sind

Bemerkungen zu dem vorhergehenden Abschnitt.

1. Bedeckt die Aminosäure nur einen kleinen Bruchteil der Kohleoberfläche, so können in Gleichung (3) die für reine wässerige Narkoticalösungen gefundenen Adsorptionskonstanten k und n eingesetzt werden. Doch ist dies unzulässig, wenn die Aminosäure einen erheblichen Bruchteil der Kohleoberfläche bedeckt

2 Die Frage, wie Grenzflächenspannung und Wirkungsstärke zusammenhängen, ergibt sich aus folgender Überlegung Wir schreiben nach FREUNDLICH[3]

$$i = -\frac{c}{RT}\frac{d\sigma}{dc} \qquad (4)$$

Hier bedeutet i die Zahl der pro Oberflächeneinheit adsorbierten Moleküle, c die Konzentration in der Lösung, σ die Grenzflächenspannung der Lösung bei der Konzentration c.

Ist ferner σ_W die Grenzflächenspannung reinen Wassers gegen das Adsorbens, so gilt für die Erniedrigung

$$\sigma_W - \sigma = k\,c^{\frac{1}{n}} \qquad (5)$$

und nach (4) und (5)

$$i = \frac{1}{n\,RT}\,k\,c^{\frac{1}{n}} \qquad (6)$$

[1] Ist n der Brechungsexponent einer Substanz, so ist nach der Theorie von LORENZ-LORENTZ $\frac{n^2-1}{n^2+2}$ der Bruchteil des von den (kugelförmig gedachten) Molekülen tatsächlich eingenommenen Raums $\frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{\text{Molekulargewicht}}{\text{spez. Gewicht}}$, die „Molekularrefraktion“, ist das Volumen V_m, das die Moleküle eines Grammolekuls tatsächlich erfüllen.

[2] FREUNDLICH, H Zeitschr. f physikal Chem 57, 385. 1907

[3] FREUNDLICH, H : Capillarchemie, S 75ff. Leipzig 1909

Betrachten wir isocapillare Lösungen zweier Narkotica I und II, d. h. Lösungen, für die

$$\sigma_W - \sigma_I = \sigma_W - \sigma_{II}, \tag{7}$$

so ergibt sich

$$\frac{x_I}{x_{II}} = \frac{n_{II}}{n_I}. \tag{8}$$

Sollen diese isocapillaren Lösungen gleich wirken, so muß sein

$$n_I (V_m^{II})^{\frac{2}{3}} = n_{II} (V_m^{I})^{\frac{2}{3}}. \tag{9}$$

Isocapillare Lösungen werden also nur ausnahmsweise gleich wirken, angenähert dann, wenn man ähnliche Stoffe von nicht allzu verschiedenem Molekularvolumen vergleicht, wie benachbarte Glieder einer homologen Reihe.

3. Während in unserem Fall die Grenzflächenspannung nur insofern von Bedeutung ist, als sie mit der Adsorption zusammenhängt, mag in anderen Fällen die Beziehung eine direktere sein, beispielsweise im Fall der Cytolyse durch Narkotica. Unsere Theorie der Narkoticawirkung bezieht sich lediglich auf die Beeinflussung chemischer Reaktionen in Zellen; sie zu verallgemeinern liegt kein Grund vor.

4. Von Narkoticis, die an der Kohle mit merklicher Geschwindigkeit verbrennen, seien besonders Thymol und Chloroform genannt. Mit diesen Stoffen kann Cystin zwar verdrängt, die Sauerstoffaufnahme jedoch nicht vermindert werden.

Wirkung der Blausäure[1].

Auch durch Blausäure können wir adsorbierte Stoffe von der Kohleoberfläche verdrängen. Da jedoch Molekularvolumen und Adsorptionskonstante der Blausäure relativ klein sind, ist zur Erzielung eines bestimmten Verdrängungsgrades eine höhere Konzentration von Blausäure erforderlich als von irgendeinem unserer Narkotica. Um beispielsweise 0,03 Millimole Cystin von 1 g Kohle zu verdrängen, muß die Blausäurekonzentration in der Lösung etwa 1 Mol pro Liter betragen, gegenüber 0,17 Molen unserer schwächsten Narkotica, Acetamid und Acetonitril. Unterhalb einer Blausäurekonzentration von $^1/_{10}$ Molen pro Liter ist keine Verdrängung mehr nachweisbar, unterhalb dieser Konzentration also sollte eine Hemmung der Cystinoxydation nicht beobachtet werden, wenn Blausäure die Sauerstoffaufnahme aus demselben Grunde hemmte wie die Narkotica.

Doch tritt eine Hemmung der Cystinoxydation schon bei einer Blausäurekonzentration von etwa 10^{-4} Molen pro Liter auf, die Hemmung ist fast vollständig bei einer Blausäurekonzentration von 10^{-3} Molen pro Liter.

Mißt man die adsorbierten Blausäuremengen einerseits, wenn die Oxydationshemmung 60% beträgt, andererseits, wenn der Verdrängungsgrad 60% beträgt, so ergibt sich folgendes (Tabelle 7).

[1] Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Tabelle 7

Blausäurekonzentration in der Lösung Mole/Liter	Pro Gramm Kohle adsorbiert		Verdrangungsgrad %	Oxydationshemmung %
	Cystin Millimole	Blausaure Millimole		
—	0,05	—	—	—
$4 \cdot 10^{-4}$	0,05	0,01	—	60
1	0,02	3	60	vollstandig

Bringen wir 3 Millimole Blausaure an die Kohle, so ist ein erheblicher Bruchteil der Oberflache mit Blausaure bedeckt, ein Teil des Cystins infolgedessen verdrangt Bringen wir 0,01 Millimole Blausaure an die Kohle, so ist ein verschwindend kleiner Bruchteil der Kohle mit Blausaure bedeckt, infolgedessen praktisch kein Cystin verdrangt; gleichwohl ist die Oxydation des Cystins erheblich verlangsamt

Die Adsorption an sich genügt also nicht, um Cystin gegenuber Sauerstoff reaktionsfahig zu machen, sondern es ist hier noch ein zweiter Faktor im Spiel, dessen Betatigung durch Blausaure ausgeschaltet wird Die Annahme liegt nahe, daß es sich um einen Stoff handelt, der in kleinen, den wirksamen Blausauremengen entsprechenden Mengen in der Blutkohle vorkommt

Schwermetallgehalt der Blutkohle[1].

Glüht man MERCKsche Blutkohle an der Luft, so bleibt eine gelblichrosa gefärbte Asche zuruck, die Eisen und Kupfer enthalt. Die Mengen an beiden Schwermetallen wurden für unser Versuchspraparat bestimmt umd zu etwa 5 Millionstel Molen Fe und 3 Millionstel Molen Cu pro Gramm Kohle gefunden Eine Hemmung der Cystinoxydation trat auf (vgl. den vorhergehenden Abschnitt), wenn pro Gramm Kohle 10 Millionstel Mole Blausaure gebunden waren, also der Großenordnung nach eine den genannten Schwermetallen entsprechende Menge

Adsorption und Sauerstoffübertragung durch Benzoesaurekohle.

Nach GLAESSNER und SUIDA[2] ist die MERCKsche Blutkohle ein kompliziertes Gemisch verschiedener Stoffe, indem beispielsweise bei der Analyse folgende Werte erhalten wurden

	C	H	N	O (S)	Asche
%	70	1,7	7,2	14,7	6,4

Stellt man Kohle aus chemisch reinen krystallierten Stoffen dar[3] — besonders geeignet ist Benzoesaure —, so erhalt man erheblich ein-

[1] Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. 155, 558. 1914 und experimenteller Teil dieser Abhandlung

[2] Ann. d Chem. u. Pharmazie 357, 95. 1907.

[3] Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

facher zusammengesetzte Präparate. Beispielsweise ergab die Analyse einer aus Benzoesäure gewonnenen Kohle:

	C	H	N	O	Asche
%	96	0,6	—	3,4	nicht wägbar

Das Präparat enthielt 0,27 Millionstel Mole Fe, also etwa 20mal so wenig wie Blutkohle. Es gelang uns nicht, eine völlig eisenfreie Kohle darzustellen.

Das Adsorptionsvermögen der Benzoesäurekohle[1] entspricht gegenüber vielen Stoffen dem der Blutkohle. Aceton und Bernsteinsäure werden etwas stärker, Amylalkohol und Cystin etwas schwächer adsorbiert als von Blutkohle. Dagegen wird Methylenblau von der Benzoesäurekohle in relativ verschwindendem Maße adsorbiert.

An Benzoesäurekohle adsorbiertes Cystin wird etwa 3mal so langsam oxydiert als an Blutkohle adsorbiertes Cystin. Tränkt man jedoch die Benzoesäurekohle mit Metallsalzen und glüht, so überträgt sie bei unverändertem Adsorptionsvermögen Sauerstoff mit größerer Geschwindigkeit auf adsorbiertes Cystin. Am wirksamsten erwies sich in dieser Hinsicht Eisensalz, indem nach Behandlung der Kohle mit diesem Metall die Geschwindigkeit der Cystinoxydation auf das 2—3fache stieg[2]. Doch stehen die Oxydationsgeschwindigkeiten keineswegs im Verhältnis der Eisenmengen. Spielt also das Metall bei der Oxydation eine Rolle, so kommt es nicht nur auf seine Menge an, sondern auch auf die Form, in der es vorliegt.

Gibt man zu einer wässerigen Kohlesuspension Schwermetallsalze, so werden die Metallionen fast vollständig aus der Lösung herausgenommen. Doch gelingt es nie, auf diese Weise die sauerstoffübertragende Fähigkeit eines Kohlepräparats zu steigern; entweder man findet keine Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme oder eine Hemmung. An Kohle adsorbiertes Metallion vermag also nicht als Sauerstoffüberträger zu wirken, sondern — damit das Metall diese Eigenschaft erlangt — muß es durch Glühen mit Kohle zunächst in einen besonderen Zustand übergeführt werden.

Theorie der Blausäurewirkung

Wir stellen uns die Kohleoberfläche als ein Mosaik schwermetallhaltiger und schwermetallfreier Bezirke vor, in dem die metallfreien

[1] Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

[2] Nach einer Beobachtung von L. WÖHLER (Zeitschr. f. angew. Chem. 31, 192. 1918) gibt es Holzkohlen, die mit flüssigem Sauerstoff explodieren. Stark adsorbierende Kohlen, die diese Eigenschaft nicht zeigten, konnten explosiv gemacht werden, wenn ihr Eisengehalt durch Tränkung mit Eisensalz auf über 3% erhöht wurde.

Bezirke bei weitem überwiegen. In welcher Form das Metall hier vorliegt, bleibt unbestimmt. Sowohl die metallhaltigen als auch die metallfreien Bezirke adsorbieren gelöste Stoffe aus wässerigen Lösungen. Narkotica, Aminosäuren und viele andere Stoffe werden von beiden Bezirken in gleichem Maße gebunden, Blausäure — dank ihrer Affinität zu Schwermetallen — vorwiegend von den metallhaltigen Bezirken. Schwerverbrennliche Stoffe, wie Aminosäuren, verbrennen nur an den metallhaltigen Bezirken, während sie an den metallfreien Bezirken gegenüber Sauerstoff beständig sind.

Bringen wir an eine cystinbeladene Kohle Blausäure, so wird das Cystin von den metallhaltigen Bezirken verdrängt und damit seine Oxydation gehemmt. Um diesen Zustand herbeizuführen, genügt sehr wenig Blausäure, weil die metallhaltigen Bezirke nur einen sehr kleinen Bruchteil der Gesamtoberfläche ausmachen. Aus dem gleichen Grunde führt die Verdrängung von den metallhaltigen Bezirken zu keiner merklichen Abnahme der adsorbierten Cystinmenge. Bei steigender Blausäurekonzentration werden auch metallfreie Bezirke der Oberfläche mit Blausäure bedeckt, erst wenn der mit Blausäure bedeckte Bruchteil der Oberfläche gegenüber der Gesamtoberfläche in Betracht kommt, nimmt die adsorbierte Cystinmenge merklich ab und es erscheint nunmehr ein Teil des vorher adsorbierten Cystins in der Lösung.

Nach dieser Theorie beruht die besondere Wirkung der Blausäure auf einer elektiven Verdrängung des Cystins von den Oxydationsorten, im Gegensatz zur Wirkung der Narkotica, die das Cystin von allen Bezirken der Oberfläche in gleichem Maße verdrängen.

Bemerkungen zu den vorhergehenden Abschnitten.

1. Wässerige Lösungen von Aminosäuren werden durch Zusatz von Eisensalz gegenüber Luftsauerstoff nicht reaktionsfähig. Eisensalz in Lösung beschleunigt im allgemeinen nur die Oxydation an sich unbeständiger Stoffe, wie der Thiophenole, der Dioxymaleinsäure.

Nach dem Vorhergehenden wird Eisensalz durch Adsorption an Kohle nicht geeigneter zur Sauerstoffübertragung, sondern gewinnt seine besonderen Eigenschaften erst dann, wenn es selbst ein Bestandteil des Adsorbens geworden ist. In welcher Form es sich hier betätigt, ist eine wichtige, jedoch noch ungeklärte Frage.

2. Entstände an der Kohle aus Blausäure und Eisen eine feste chemische Verbindung, etwa Ferrocyankalium, so würde Blausäure auf zweierlei Art von Kohle gebunden, nämlich als Ferrocyankalium und durch Adsorption. In diesem Fall müßten bei niedrigen Blausäurekonzentrationen Abweichungen von dem Adsorptionsgesetz auftreten, die jedoch nicht beobachtet werden[1]. Wir fassen deshalb die Bindung der Blausäure an alle, auch an die schwermetallhaltigen Bezirke der Kohleoberfläche, als Adsorption auf.

---

[1] Experimenteller Teil dieser Abhandlung.

Auch in lebenden Zellen dürften schwerlich feste Verbindungen vom Typus des Ferrocyankaliums entstehen, da sich die Blausäure schnell und vollständig aus Zellen auswaschen läßt, da ferner bei der sauern Reaktion vieler Zellen die Bedingungen zur Bildung von Ferrocyankalium nicht gegeben sind.

3. Im allgemeinen tritt eine Hemmung der Zellatmung bei Blausäurekonzentrationen von $^1/_{10000}$ Molen pro Liter auf, so in Bakterien, tierischen Eiern, Spermatozoen, Blutzellen, Leberzellen, Ganglienzellen. Doch kennen wir einen Organismus — die Grunalge Chlorella vulgaris —, dessen Atmung erst durch eine $^n/_{10}$-Blausäurelosung merklich gehemmt wird. Moglicherweise ist hier die Verwandtschaft zwischen Blausaure und Eisen nicht großer, als die Verwandtschaft zwischen dem verbrennenden Stoff und Eisen, so daß in der Konkurrenz um die Oxydationsorte Blausäure erst bei hohen Konzentrationen im Vorteil ist

4. Nach einer Beobachtung von MATHEWS und WALKER (Journ. of biol. chem. 6, 29. 1909) wird die Oxydation von Cystein zu Cystin in wasseriger Losung durch kleine Mengen Cyanid gehemmt; sie wird, wie seit BAUMANN bekannt ist, durch Eisensalz erheblich beschleunigt.

Bei der Darstellung des Cysteins (Reduktion von Cystin mit Zinn und Salzsäure) ist eine Verunreinigung mit Eisen schwer zu vermeiden; es ist uns nicht gelungen, eisenfreie Cysteinpräparate zu gewinnen. Wir nehmen deshalb zunächst an, daß auch in diesem Fall die Blausäurewirkung auf der Bindung des Eisens oder eines anderen Schwermetalls beruht.

III. Ergebnisse.

Wir stellen schließlich die wesentlichsten Ergebnisse der Zellversuche und der Modellversuche zusammen

Zellversuche

1 Die Atmung ist an die festen Zellbestandteile gebunden.

2 Wie Kohle adsorbieren die festen Zellbestandteile geloste Stoffe aus wasserigen Losungen

3 Narkotica beeinflussen die Atmung durch physikalische Zustandsanderung der Oberflachen

4 Die Atmung ist eine Eisenkatalyse

5 Blausaure hemmt die Atmung, indem sie das Eisen in eine zur Sauerstoffubertragung unfahige Form uberfuhrt

Modellversuche

1 Brennstoffe der Zelle, Aminosauren, werden durch Adsorption an Blutkohle in gleichem Maße gegenuber Sauerstoff unbestandig wie in lebenden Zellen, und verbrennen an der Kohleoberflache zu denselben Endprodukten wie in lebenden Zellen

2 Die Verbrennung der Aminosauren an Kohle wird durch Narkotica in gleicher Weise wie die Zellatmung beeinflußt, durch physikalische Zustandsanderung der Oberflächen.

Diese Zustandsänderung besteht in einer Bedeckung und dadurch bedingten Verkleinerung der wirksamen Oberflachen.

3. Blausäure hemmt die Verbrennung an Kohle durch Bindung eines in kleiner Menge vorhandenen Bestandteils, wahrscheinlich des Eisens der Blutkohle

Theorie der Zellatmung

Es sind 2 Mittel, deren sich die Zelle bedient, um die Reaktionswiderstände an den Verbrennungsorten zu verkleinern der Adsorption und der Schwermetalle.

Die Zellatmung ist ein capillarchemischer Vorgang, der an den eisenhaltigen Oberflächen der festen Zellbestandteile ablauft Durch Adsorption an diesen Oberflachen werden die tragen organischen Verbindungen aus dem gleichen Grunde gegenüber Sauerstoff reaktionsfähig, wie die Aminosauren an der Oberflache der Blutkohle Die Zellatmung ist damit zwar nicht physikalisch erklart, jedoch zurückgeführt auf Phanomene der unbelebten Welt

Narkotica hemmen die Zellatmung, indem sie — selbst an den Oberflächen nicht oxydabel — die Oberflachen bedecken und dadurch die Brennstoffe verdrangen Gleiche Wirkung durch verschiedene Narkotica tritt immer dann ein, wenn der gleiche Bruchteil der wirksamen Oberflachen mit Narkoticum bedeckt ist Auch für die Zellatmung gilt die Bedingung gleicher Wirkung:

Zahl der adsorbierten Molekule × der von einem Molekul beanspruchten Flache = K,

eine Beziehung, aus der die Wirkungsstarken fur beliebige Narkotica berechnet werden können, wenn K, die Adsorptionskonstanten und die Molekularvolumina gegeben sind

Bemerkung zu vorstehender Theorie

Verbrennt eine Aminosäure an der Kohleoberflache, so geht die gesamte freie Energie der Verbrennung verloren. Verbrennt eine Aminosaure an den Oberflächen der lebenden Zelle, so erscheint die freie Energie der Verbrennung zum Teil als Arbeit, beispielsweise als mechanische Arbeit. In bezug auf den Energieumsatz unterscheidet sich also das Kohlemodell von seinem Vorbild.

Doch ist anzunehmen, daß die Auffassung der Atmung als Oberflächenreaktion den Weg zeigen wird, auf dem die Energieumwandlung in der lebenden Zelle erfolgt. Bringt man einen Quecksilbertropfen in Chromsaurelosung[1], so ist die Oxydation bei geeigneter Versuchsanordnung mit einer lebhaften Bewegung des Metalls verbunden; hier wird die freie Energie der Oxydation zum Teil als mechanische Arbeit gewonnen, indem die Krafte der Oberflachenspannung Arbeit leisten. Vermutlich verwandelt die lebende Zelle auf ähnliche Weise chemische Energie der Atmung in Arbeit.

[1] Paalzow: Poggendorffs Ann. 104, 418. 1858 — Bernstein: Pflugers Arch. f d. ges Physiol. 80, 628. 1900

IV. Experimenteller Teil.

(Versuche an dem Atmungsmodell Kohle-Aminosäure von dem Verfasser und E. Negelein).

1. *Adsorptionsverdrängung und Oxydationshemmung durch Narkotica.*

Als Adsorbens wurde Mercksche Blutkohle verwendet, für alle Versuche dasselbe Praparat, von dem eine größere Menge beschafft worden war; als Aminosaure aus Haaren hergestelltes Cystin, dessen spezifische Drehung — für die D-Linie in Normalsalzsaure — — 216° betrug.

Zu je 100 ccm einer 0,036proz Cystinlösung wurden 2 g Kohle und wechselnde Mengen verschiedener Narkotica gegeben. In einem Teil der so hergestellten Kohlesuspensionen wurde die Oxydationsgeschwindigkeit der Aminosaure gemessen, der Rest diente zur Adsorptionsmessung

Messung der Adsorption. Die Cystinlosungen wurden durch Kochen von 36 mg feingepulverter Aminosaure mit 100 ccm Wasser bereitet, in einem Thermostaten auf 40° abgekuhlt, bei der gleichen Temperatur einige Minuten mit Kohle geschuttelt und dann filtriert. Nach Zugabe von $^1/_{10}$ Volumen 11fach n-Salzsaure wurde α_D fur eine 2 dm lange Schicht (Fehler 0,005°) gemessen und der Prozentgehalt P der gepruften Losung nach der Formel

$$P = \frac{\alpha_D \cdot 100}{[\alpha]_D \cdot 2} 1,1$$

berechnet

Aus dem Prozentgehalt P_0 vor Zugabe der Kohle und dem Prozentgehalt P_1 in dem Kohlefiltrat ergaben sich die pro Gramm Kohle absorbierten Millimole Cystin:

$$x = \frac{(P_0 - P_1)\,1000}{2 \cdot 240},$$

worin 240 das Molekulargewicht des Cystins bedeutet Mit x im Gleichgewicht standen

$$C = \frac{10\,P_1}{240} \text{ Mole Cystin pro Liter Losung}$$

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit wurden 10 ccm Kohlesuspension in ein Schuttelgefaß pipettiert mit Sauerstoff von 96 Vol.-% gesattigt und bei 40° die an Barcroftschen Manometern auftretenden Druckanderungen in oft beschriebener Weise beobachtet Der Einsatz des Schüttelgefaßes enthielt zur Adsorption der Kohlensaure 1 ccm 5proz Kalilauge, das Gesamtvolumen der eingefullten Flüssigkeit betrug also 11 ccm Der Gasraum bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit war 19 ccm Aus den gegebenen Bedingungen berechnet sich

die Gefäßkonstante[1] zu 1,7; 1 mm Druckabnahme zeigte einen Sauerstoffverbrauch von 1,7 cmm an.

10 ccm der Kohlesuspension enthielten 200 mg Kohle, 3,6 mg Cystin und wechselnde Mengen Narkoticum. In den narkoticumfreien Suspensionen waren nach 30 Minuten etwa 200 cmm, nach 6 Stunden, wenn die Oxydation beendigt war, etwa 1200 cmm Sauerstoff verbraucht. Vernachlässigte man den Cystinverbrauch in der Anfangsperiode von 30 Minuten, so konnte die nach 30 Minuten beobachtete Sauerstoffaufnahme als Maß der Oxydationsgeschwindigkeit bei konstanter Cystinmenge betrachtet werden.

Das Ergebnis je eines Versuchs mit Aceton, Dimethylharnstoff und Amylalkohol ist in Tabelle 8 zusammengestellt. Unter Spalte 1 sind die Gesamtmengen an Narkoticum angegeben, die 100 ccm der Kohlesuspension zugesetzt wurden. Nach den in Spalte 2 wiedergegebenen Drehungsmessungen drangen die zugesetzten Narkotica mehr als die Hälfte des adsorbierten Cystins in die Lösung zurück, nach Spalte 3 hemmen sie die Sauerstoffaufnahme um mehr als die Hälfte. In der letzten Spalte sind Verdrängungsgrad und Oxydationshemmung einander gegenübergestellt. Die Zahlen zeigen, daß beide Werte nahe übereinstimmen, doch ist die Oxydationshemmung etwas größer als der Verdrängungsgrad. Dieser Unterschied wurde regelmäßig gefunden und beruht nicht auf Versuchsfehlern. Zur Erklärung nehmen wir an,

Tabelle 8. *Verdrängung und Oxydationshemmung durch Narkotica.*

Versuch	Spalte 1			Spalte 2		Spalte 3	Spalte 4	
	System			Adsorption des Cystins				
	0,036proz Cystinlösung (ccm)	Kohle (g)	Narkoticum (g)	Drehung der Lösungen (Kohlefiltrat) im 2-dm-Rohr	Pro Gramm Kohle adsorbierte Cystinmenge (Millimole)	10 ccm der Kohlsuspension verbrauchten in 30 Min Sauerstoff (cmm)	Verdrängungsgrad (in %)	Hemmung der Sauerstoffaufnahme (in %)
	100	—	—	—0,145°	—	—		
1	100	2	—	—0,055°	0,05	205	58	65
	100	2	0,58 g Aceton	—0,105°	0,021	72		
	100	—	—	—0,140°	—	—		
2	100	2	—	—0,050°	0,049	221	55	66
	100	2	0,45 g Dimethylharnstoff (asym.)	—0,100°	0,022	75		
	100	—	—	—0,140°	—	—		
3	100	2	—	—0,044°	0,052	245	60	66
	100	2	0,17 g n. Amylalkohol	—0,100°	0,021	82		

[1] Warburg, O. u. E. Negelein: diese Zeitschr. **113**, 257. 1921.

daß die Narkotica nicht nur die Aminosäure, sondern — wenn auch in geringerem Maße — den adsorbierten Sauerstoff von der Kohleoberfläche verdrängen

2. *Adsorption der Narkotica.*

Bringen wir in 100 ccm einer 0,036 proz. Cystinlösung 2 g Kohle und bestimmen die Verteilung des Cystins, ehe merkliche Mengen oxydiert sind, so finden wir nach den Drehungswinkeln der Tabelle 8

Konzentration in der Lösung (Mole/Liter)	Adsorbierte Menge (Millimole/Gramm)
$0{,}54 \cdot 10^{-3}$	0,05.

Fügen wir so viel Narkoticum hinzu, daß die Oxydationsgeschwindigkeit um etwa 66% sinkt, so ist nach den Drehungswinkeln der Tabelle 8 die Verteilung des Cystins

Konzentration in der Lösung (Mole/Liter)	Adsorbierte Menge (Millimole/Gramm)
$1{,}1 \cdot 10^{-3}$	0,021.

Von 1 g Kohle sind mithin 0,029 Millimole Cystin verdrängt

Um diesen Verdrängungsgrad zu erzielen, müssen die in Tabelle 9 verzeichneten Mengen verschiedener Narkotica zugesetzt werden

Tabelle 9 *Oxydationshemmung durch Narkotica*

Narkoticum	100 ccm einer 0,036proz Cystinlösung + 2 g Kohle		10 ccm der Kohlesuspension verbrauchen in 30 Min Sauerstoff	Hemmung der Sauerstoffaufnahme
	mg	Millimole	cmm	in %
Acetamid	— 1140	— 19,4	195 70	62
Valeramid (iso)	— 156	— 1,54	213 73	65
Aceton	— 580	— 10	205 72	65
Methylphenylketon	— 174	— 1,45	205 71	65
Acetonitril	— 820	— 20	207 71	65
Valeronitril .	— 149	— 1,8	217 75	65
Dimethylharnstoff (asym.)	— 450	— 5,12	221 75	66
Diäthylharnstoff (sym.)	— 180	— 1,56	221 80	64
Phenylharnstoff . . .	— 208	— 1,53	202 70	65

Tabelle 10. *Adsorption der Narkotica.*

Narkoticum	Molekulargewicht	Molekularrefraktion fur die D-Linie M_D	100 ccm Wasser + 2 g Kohle + mg	Millimole	Verteilungsmessungen: Vor Schutteln mit Kohle	Verteilungsmessungen: Nach Schutteln mit Kohle	Verteilung berechnet: Pro Gramm Kohle adsorbiert x Millimole	Verteilung berechnet: Konzentration in der Losung C-Mole/Liter	$x\,(M_D)^{\frac{3}{2}}$
Acetamid . .	59	14,9	1140	19,4	5 ccm = 9,7 $^n/_{10}$-NH_3	5 ccm = 8,5 $^n/_{10}$-NH_3	1,2	0,17	7,3
Valeramid (iso)	101	28,7	156	1,54	50 ccm = 7,7 $^n/_{10}$-NH_3	50 ccm = 1,5 $^n/_{10}$-NH_3	0,62	0,003	6,9
Aceton.	58	16,2	580	10	5 ccm = 30 $^n/_{10}$-Jod	5 ccm = 22 $^n/_{10}$-Jod	1,33	0,073	8,3
Methylphenylketon	120	36,3	174	1,45	Tropfengewicht reines H_2O · 126,9 mg Tropfengewicht Losung · 117 mg	Tropfengewicht 126,9 mg	0,73	< 0,0004	8,0
Acetonitril	41	11,1	820	20	$\Delta = 0{,}367^0$	$\Delta = 0{,}311^0$	1,5	0,17	7,7
Valeronitril (iso)	83	25,0	149	1,8	Tropfengewicht reines Wasser 127,5 mg Tropfengewicht Losung: 116,4 mg	Tropfengewicht 126,3 mg	0,8	0,0021	6,9
Dimethylharnstoff (asym.)	88	23,3	450	5,12	20 ccm = 20,5 $^n/_{10}$-NH_3	20 ccm = 11,7 $^n/_{10}$-NH_3	1,1	0,03	9,0
Diathylharnstoff (sym.)	116	32,4	180	1,56	40 ccm = 12,5 $^n/_{10}$-NH_3	40 ccm = 1,7 $^n/_{10}$-NH_3	0,68	0,002	6,9
Phenylharnstoff	136	38,8	208	1,53	50 ccm = 15,3 $^n/_{10}$-NH_3	50 ccm = 0,2 $^n/_{10}$-NH_3	0,76	0,0002	8,7
								Mittel	7,7

Gepruft wurden insbesondere 4 homologe Reihen, Amide, Ketone, Nitrile und Harnstoffe Je ein Glied hoher und niedriger Adsorptionskonstante ist in der Tabelle nebeneinander gestellt Man sieht, daß von dem Glied niedriger Adsorptionskonstante immer eine erheblich großere Menge zugesetzt werden muß als von dem Glied hoher Adsorptionskonstante

Da kleine Cystinmengen die Adsorption der Narkotica nicht beeinflussen, wurde die Verteilung der Narkotica in cystinfreien Kohlesuspensionen gemessen, und zwar fur die Amide und Harnstoffe durch Stickstoffbestimmungen nach KJELDAHL, fur Aceton jodometrisch nach MESSINGER, fur Acetonitril kryoskopisch, fur Methylphenylketon und Valeronitril durch Wagung der von einem TRAUBEschen Stalagmometer abfallenden Tropfen Die adsorbierten Mengen — auf die es vor allem ankam — konnten so (vgl Tabelle 10) auf 5—10% genau bestimmt werden; die Konzentrationen in der Losung im allgemeinen mit derselben Genauigkeit, fur

Valeronitril auf etwa 20%, während sich für Methylphenylketon nur eine obere Grenze der Konzentration ergab

Was die Molekularrefraktionen anbetrifft (Tabelle 10), so wurden sie aus den von EISENLOHR[1] und BRÜHL für die D-Linie angegebenen Refraktionsäquivalenten berechnet unter Benutzung folgender Werte

für Kohlenstoff	2,4
„ Wasserstoff	1,1
„ Carbonylsauerstoff	2,2
„ prim aliph. Amidstickstoff	2,3
„ sek aliph. Amidstickstoff	2,5
„ tertiären aliph. Amidstickstoff	2,8
„ sek Amidstickstoff mit einem Phenylrest	3,6
„ aliph Nitrilstickstoff	3,1
„ doppelte Bindung	1,7

3 *Adsorptionsverdrängung und Oxydationshemmung durch Blausäure.*

Verdrängung des Cystins Blausäure, deren Gehalt titrimetrisch bestimmt war, wurde zu cystinhaltigen Kohlesuspensionen zugesetzt, nach kurzem Schütteln wurde filtriert und die adsorbierte Cystinmenge polarimetrisch ermittelt Hierbei waren die Mengenverhältnisse an Cystinlösung Wasser und Kohle etwa dieselben wie bei den Narkotica-versuchen, nämlich 100 ccm Wasser, 34 mg Cystin und 200 mg Kohle.

In Tabelle 11 ist eine Versuchsreihe mit wechselnden Blausäuremengen zusammengestellt Ein Zusatz von 254 mg = 9,4 Millimolen Blausäure bewirkt eine eben meßbare Verdrängung, ein Zusatz von 2540 mg = 94 Millimolen Blausäure bewirkt eine Adsorptionsverdrängung von etwa 50% Blausäure ist also weniger wirksam als unser schwächstes Narkoticum, Acetamid

Tabelle 11 *Adsorptionsverdrängung durch Blausäure.*

System			Drehung der Cystinlösung und der Kohle filtrate im 2-dm-Rohr	Verteilung des Cystins		Verdrängungsgrad
0,034 proz Cystinlösung ccm	Kohle g	Blausäure	α_D	r Pro g Kohle adsorbierte Millimole Cystin	c Mole Cystin pro Liter Lösung	%
100	—	—	—0,135°	—	—	—
100	2	—	—0,045°	0,0475	$0,48 \cdot 10^{-3}$	—
100	2	2540 mg = 94 Millimole	—0,087°	0,0255	$0,93 \cdot 10^{-3}$	46
100	2	1270 mg = 47 Millimole	—0,065°	0,0370	$0,69 \cdot 10^{-3}$	22
100	2	635 mg = 23,5 Millimole	—0,058°	0,0408	$0,62 \cdot 10^{-3}$	14
100	2	254 mg = 9,4 Millimole	—0,048°	0,0463	$0,51 \cdot 10^{-3}$	3

[1] Vgl. EISENLOHR in Landolt-Börnstein, S 1039 u. 1040. Berlin 1912.

Tabelle 12. *Oxydationshemmung durch Blausaure*

I. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 36 mg = 0,15 Millimole Cystin
II. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausaure.
III. 100 ccm Wasser, 2 g Kohle, 36 mg = 0,15 Millimole Cystin, 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausäure

40° Sauerstoffdruck 700 mm Hg

Zeit Minuten	10 ccm I. Cystin allein (a) Verbrauchter Sauerstoff cmm	10 ccm II. Blausäure allein (b) Verbrauchter Sauerstoff cmm	10 ccm III. Cystin-Blausaure (c) Verbrauchter Sauerstoff cmm	Cystinoxydation nach Abzug der Selbstoxydation der Blausaure c—b
10	53	5	23	18
20	125	12	54	42
30	200	16	87	71
49	332	21	162	141
70	448	26	256	230
90	540	32	344	312
110	628	46	432	377
150	750	54	541	487
190	836	61	620	559
230	900	65	678	613
280	967	72	738	666
330	1012	75	783	708
395	1066	81	835	754
∞	1170			

Oxydationshemmung durch Blausaure. Gibt man zu derselben Mischung von Wasser, Cystin und Kohle 1,5 mg = 0,055 Millimole Blausaure, so wird die Oxydationsgeschwindigkeit des Cystins fur die ersten 30 Minuten um etwa 60% gehemmt; im Laufe der Zeit nimmt die Hemmung ab, weil Blausaure selbst an der Kohleoberflache oxydiert wird Der Verlauf eines derartigen Versuchs ist in Tabelle 12 zahlenmaßig, in Abb 1 graphisch wiedergegeben Die Gesamtkonzentration an Blausaure war hierbei $0{,}55 \cdot 10^{-3}$ pro Liter Kohlesuspension und bewirkte eine Oxydationshemmung von 60%, wahrend nach dem Vorhergehenden die 2000fache Gesamtkonzentration an Blausaure zur

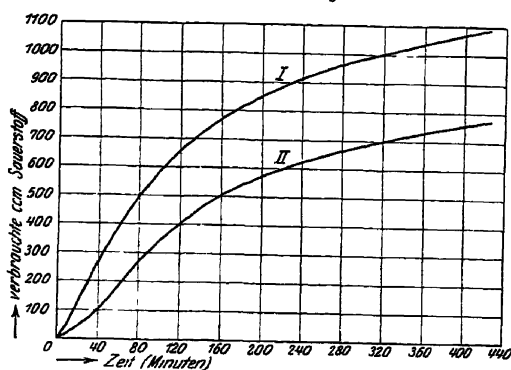



Abb 1

Erzielung eines Verdrangungsgrades von 50% nötig ist. Blausäure hemmt also die Cystinoxydation nicht durch Verdrängung.

4. *Die Adsorption der Blausaure*

wurde durch Titration der Kohlefiltrate mit Silbernitrat bestimmt, und zwar fur konzentriertere Losungen mit $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$ nach LIEBIG, fur verdunnte Losungen mit $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$ nach DENIGES[1]. Nach der letzteren Methode ist der Umschlag hinreichend scharf, wenn man vor Beginn der Titration zu 100 ccm Blausäurelösung 2 ccm 33proz. Jodkalilösung und 2 ccm 25proz Ammoniakflüssigkeit zusetzt. Um Verluste durch Verdunsten der Blausaure zu vermeiden, wurden die konzentrierteren Lösungen auf bedeckten Trichtern filtriert

Das Resultat einer Versuchsreihe ist in Tabelle 13 wiedergegeben. Wie man sieht, wird Blausaure, im Vergleich zu den narkotischen Substanzen, nur schwach adsorbiert, etwa so wie die Anfangsglieder unserer homologen Reihen (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 13 *Adsorption der Blausäure*

Versuch	System			Titrationen	Verteilung	
	Wasser + HCN ccm	HCN Millimole	Kohle g		*c* Mole pro Liter-Losung	*x* Pro Gramm Kohle adsorbierte Millimole
1	100	93	—	5 ccm = 23,3 $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$	880 10^{-3}	2,6
			2	5 „ = 22,0 $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$		
2	100	10	—	20 „ = 10,0 $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$	89 10^{-3}	0,55
			2	20 „ = 8,9 $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$		
3	100	0,86	—	100 „ = 4,3 $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$	7 10^{-3}	0,08
			2	100 „ = 3,5 $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$		
4	100	0,058	—	100 „ = 2,9 $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$	0,38 10^{-3}	0,01
			2	100 „ = 1,9 $^{n}/_{100}$-$AgNO_3$		

5 *Vergleich von Blutkohle und Benzoesaurekohle*

Herstellung der Benzoesaurekohle 40 g Benzoesaure wurden mit 12 g Kaliumcarbonat gemischt und in einem Porzellantiegel langsam verkohlt Dann wurde bei bedecktem Tiegel 15 Minuten vor dem Geblase auf Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten fein gepulvert, 2 mal mit eisenfreier Salzsaure heiß extrahiert, mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen, getrocknet und schließlich 1 Minute im offenen Porzellantiegel gegluht Ausbeute 3 g

Um die Waschflüssigkeiten moglichst eisenfrei zu halten, geschah die Extraktion in Porzellangefaßen, die Trennung von den Extraktions-

---

[1] CLASSEN: Theorie und Praxis der Maßanalyse, S. 655. Leipzig 1912.

flussigkeiten nicht durch Filtrieren, sondern durch Dekantieren Die geringen Eisenmengen, die sich trotz dieser Vorsichtsmaßregeln stets in den Praparaten fanden, stammen aus dem Kaliumcarbonat

Bei der Elementaranalyse wurde erhalten aus 0,276 g Kohle kein Stickstoff, aus 0,1589 g Kohle 0,0082 g Wasser und 0,5565 g Kohlensaure. Daraus berechnet sich die Zusammensetzung 96% C, 0,6% H und 3,4% O

Zur Bestimmung des Eisens wurden 0,5—1 g Kohle im Porzellantiegel bis zum Verschwinden der Kohle gegluht, mit eisenfreier Salzsaure und einem Kornchen Kaliumchlorat zur Trockne verdampft und mit Salzsaure und Wasser auf 10 ccm gebracht 1 ccm dieser Losung[1] wurde mit 1 ccm 10proz Kaliumrhodanidlosung, 1 ccm 6fach n-Salzsaure und 1 ccm Äther vermischt und die im Ather auftretende Rotfarbung mit einer Serie von Farbungen verglichen, die mittels einer Eisenchloridlosung von bekanntem Gehalt in sonst gleicher Weise erzeugt worden waren In 1 ccm der Aschenlosung wurden hierbei einige $^{1}/_{1000}$ bis $^{1}/_{100}$ Milligramme Eisen gefunden Ein blinder Versuch, in dem die gleichen Mengen an Wasser, Salzsaure und Kaliumchlorat im Porzellantiegel eingedampft und dann auf 5 ccm aufgefullt waren, ergab pro Kubikzentimeter weniger als $^{1}/_{10000}$ mg Eisen

Die fur unsere Blutkohle und 2 Benzoesaurekohlen erhaltenen Werte sind folgende

	mg Fe	Milliontel Mole Fe
1 g Blutkohle enthielt	0,26	4,6
1 ,, Benzoesaurekohle enthielt	0,01	0,18
1 ,, Benzoesaurekohle enthielt	0,015	0,27

Zur Bestimmung des Kupfers wurden 10 g Blutkohle im Porzellantiegel verascht, 2 mal mit 10proz heißer Salzsäure extrahiert und das Filtrat heiß mit Schwefelwasserstoff gesattigt Der schwarze Niederschlag wurde auf der Zentrifuge mit H_2S-haltiger Salzsaure gewaschen, das Sediment mit einigen Tropfen Salpetersaure eingedampft, in verdunnter Salpetersaure aufgenommen, filtriert und auf 5 ccm aufgefullt Die Flussigkeit farbte sich mit uberschussigem Ammoniak blau und gab mit Ferrocyankalium einen braunen Niederschlag Zur Bestimmung wurden 0,2 ccm der Flussigkeit auf 10 ccm aufgefullt und 0,1 ccm einer 1 proz Ferrocyankaliumlosung zugefugt Die hierbei auftretende Braunfarbung wurde mit einer Serie von Farbungen verglichen, die mittels einer Kupfersulfatlosung von bekanntem Gehalt in sonst gleicher Weise erzeugt worden waren Es wurden so in einem Gramm Blutkohle 1,68 mg = 2,65 Millionstel Mole Cu gefunden

Adsorptionsvermogen der beiden Kohlen Je 1 g bei 120° getrock-

[1] Methode von LACHS und FRIEDENTHAL diese Zeitschr **32**, 130 1911.

neter Kohle wurde mit 100 ccm Losung einige Minuten geschuttelt und der Gehalt der verschiedenen Stoffe in der Losung vor und nach dem Schütteln mittels folgender Methoden bestimmt. Aceton jodometrisch nach MESSINGER, Bernsteinsaure acidimetrisch, Amylalkohol durch Wagung des von einem TRAUBEschen Stalagmometer abfallenden Tropfens, Cystin polarimetrisch Die Resultate sind in Tabelle 14 zusammengestellt Wie man sieht, wird Aceton von der Benzoesaurekohle, Cystin von der Blutkohle besser adsorbiert, wahrend das Adsorptionsvermogen beider Kohlen gegenuber Bernsteinsaure und Amylalkohol etwa das gleiche ist

Ganz anders fallt der Vergleich gegenuber Methylenblaulosungen aus Schuttelt man 0,5 g Blutkohle mit 100 ccm einer 0,15proz Methylenblaulosung, so ist nach 20 Minuten fast der gesamte Farbstoff adsorbiert Wiederholt man den Versuch mit Benzoesaurekohle, so findet man nach der

Tabelle 14 *Adsorptionsvermogen von Blutkohle und Benzoesaurekohle*
Je 1 g Kohle + 100 ccm Losung

Substanz	Kohlepraparat	Messungen: vor dem Schutteln mit Kohle	Messungen: nach dem Schutteln mit Kohle	Verteilung berechnet: x pro Gramm Kohle adsorbierte Millimole	Verteilung berechnet: C Mol pro Liter Losung
Aceton	Blutkohle	10 ccm = 6 ccm $^n/_{10}$-Jod	10 ccm = 3,3 $^n/_{10}$-Jod	0,45	$0,55 \cdot 10^{-2}$
	Benzoesaurekohle	10 ccm = 6 ccm $^n/_{10}$-Jod	10 ccm = 1,6 $^n/_{10}$-Jod	0,73	$0,27 \cdot 10^{-2}$
Bernsteinsaure	Blutkohle	10 ccm = 2,1 ccm $^n/_{10}$-NaOH	10 ccm = 0,5 ccm $^n/_{10}$-NaOH	0,8	$2,5 \cdot 10^{-3}$
	Benzoesaurekohle	10 ccm = 2,1 ccm $^n/_{10}$-NaOH	10 ccm = 0,4 ccm $^n/_{10}$-NaOH	0,85	$2,0 \cdot 10^{-3}$
n-Amylalkohol	Blutkohle	Tropfengewicht reines Wasser 128,7 mg Tropfengewicht Losung 81 mg[1]	Tropfengewicht 95,3 mg[1]	3,9	$3,6 \cdot 10^{-2}$
	Benzoesaurekohle	Tropfengewicht reines Wasser 128,7 mg Tropfengewicht Losung 81 mg[1]	Tropfengewicht 91,1 mg[3]	3,1	$4,4 \cdot 10^{-2}$
Cystin	Blutkohle	α_D im 2-Dez-Rohr $-0,142^0$	α_D im 2-Dez-Rohr $-0,075^0$	0,071	$0,79 \cdot 10^{-3}$
	Benzoesaurekohle	α_D im 2-Dez-Rohr $-0,142^0$	α_D im 2-Dez-Rohr $-0,098^0$	0,046	$1,04 \cdot 10^{-3}$

[1] 0,66 g Amylalkohol 100 ccm [2] Entsprechend 0,32 g Amylalkohol · 100 ccm [3] Entsprechend 0,39 g Amylalkohol · 100 ccm.

gleichen Zeit fast den gesamten Farbstoff in Lösung Das Adsorptionsvermögen der Blutkohle gegenuber Methylenblau ist von einer anderen Größenordnung als das der Benzoesaurekohle

Sauerstoffübertragung durch beide Kohlen. Wahrend in Wasser suspendierte MERCKsche Blutkohle keinen Sauerstoff aufnimmt, verbrauchen Benzoesaurekohlen unter den gleichen Bedingungen stets Sauerstoff. Diese „Selbstoxydation" wurde bei jedem Cystinversuch mitbestimmt und von dem fur Cystin erhaltenen Wert in Abzug gebracht Aus Versuch 1 und 2 der Tabelle 15 geht hervor, daß auch Benzoesäurekohle Sauerstoff auf Cystin ubertragt, jedoch erheblich langsamer als Blutkohle.

Tabelle 15.

Sauerstoffubertragung durch Blutkohle und Benzoesaurekohle

Versuch	Kohlepräparat	System				10 ccm der Kohlesuspension verbrauchen in 30 Min Sauerstoff	In 30 Min auf Cystin übertragener Sauerstoff	Eisengehalt pro g Kohle Milliontel Mole
		Wasser ccm	Cystin mg	Kohle g	Metallsalz mit 1 g Kohle gegluht	cmm	cmm	
1	Blutkohle	100	36	1	—	140	140	4,6
2	Benzoesäurekohle	100	—	1	—	30	40	0,2
		100	36	1	—	70		
3 Eisen	Benzoesäurekohle	100	—	1	20 10^{-6} Mole $FeCl_3$	51	104	20
		100	36	1	20 · 10^{-6} Mole $FeCl_3$	155		
4 Mangan	Benzoesaurekohle	100	—	1	20 10^{-6} Mole $MnCl_2$	66	95	—
		100	36	1	20 · 10^{-6} Mole $MnCl_2$	161		
5 Cer	Benzoesaurekohle	100	—	1	20 10^{-6} Mole $CeCl_3$	56	78	—
		100	36	1	20 10^{-6} Mole $CeCl_3$	134		

Trankt man die Benzoesäurekohle mit Metallsalzen und erhitzt eine Minute im offenen Porzellantiegel zur Rotglut, so erhalt man Praparate, die zwar nicht merklich starker adsorbieren, jedoch das adsorbierte Cystin mit größerer Geschwindigkeit oxydieren (Versuche 2, 3 und 4 der Tabelle 15) Von vielen Metallsalzen, die gepruft wurden, erwies sich am wirksamsten Eisen, wahrend Kupfer in keinem Fall einen Einfluß auf die Sauerstoffübertragung ausübte In der letzten Spalte der Tabelle 15 sind die Eisengehalte der verschiedenen Kohlen verzeichnet Ein Vergleich mit den Oxydationsgeschwindigkeiten (vorletzte Spalte) lehrt, daß diese durchaus nicht im Verhältnis der Eisenmengen stehen.

Tabelle 16. *Einfluß adsorbierter Metallsalze auf die Cystinoxydation.*

System			10 ccm Kohlesuspension verbrauchen in 30 Min. Sauerstoff
0,036 proz. Cystinlösung ccm	Blutkohle g	Metallsalz der Kohlesuspension zugesetzt	cmm
100	1	—	132
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $MnCl_2$	117
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $FeCl_3$	89
100	1	$40 \cdot 10^{-6}$ Mole $CuCl_2$	42

Tabelle 16 gibt eine Versuchsreihe wieder, in der sich an der Kohleoberfläche neben Cystin verschiedene, aus wässeriger Lösung adsorbierte Metallsalze befanden. Wie man sieht, hat das adsorbierte Metallsalz durchweg einen hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme.

Biochem. Zeitschr **136**, 266 1923

Über die antikatalytische Wirkung der Blausäure.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 2. Januar 1923.)

Die vorliegende Arbeit bildet die Fortsetzung einer Untersuchung über die „Physikalische Chemie der Zellatmung"[1] und zerfällt in folgende Abschnitte

I. Wirkung der Blausäure auf die Verbrennung von Leucin und Oxalsäure an Blutkohle

II. Wirkung der Blausäure auf Kohlepräparate verschiedenen Eisengehalts

III. Bindung des Sauerstoffs durch verschiedene Kohlepräparate.

IV. Wirkungsweise der Blausäure

V. H. WIELANDS Theorien

VI. Beschreibung der Versuche

I.

Die Wirkung der Blausäure auf die Cystinoxydation an Blutkohle ist als eine Wirkung auf den Katalysator, die Blutkohle, aufgefaßt worden[2]. Daß diese Auffassung richtig ist — daß es sich also nicht um eine Reaktion mit dem Substrat, etwa Cystinschwefel, handelt —, ergibt sich aus den folgenden Versuchen, in denen Cystin durch Leucin und Oxalsäure ersetzt wurde und in denen analoge Erscheinungen auftraten, wie im Falle der Cystinoxydation.

Die Versuche wurden so angestellt, daß Kohle in Lösungen von Leucin und Blausäure, von Oxalsäure und Blausäure eingetragen und einerseits die Adsorption, andererseits die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme gemessen wurde. Die adsorbierten Mengen an Leucin, Oxalsäure und Blausäure zu Beginn eines Oxydationsversuchs waren so in jedem Falle bekannt und konnten, falls die Zeiten nicht zu lange waren, während der Oxydationsmessungen als konstant betrachtet werden.

---

[1] WARBURG, O.: diese Zeitschr. **119**, 134. 1921.

[2] DERSELBE, ebendaselbst; Zeitschr. f. Elektrochem. 1922, S. 70.

Die Versuche, die unter Nr 1 und Nr 2 im Abschnitt VI naher beschrieben sind, ergaben folgendes Blausaure hemmt die Oxydation von Leucin und Oxalsaure an Blutkohle, ohne daß die adsorbierte Menge beider Stoffe merklich abnimmt. Wir finden eine Hemmung der Leucinoxydation um 56%, wenn die Blausaurekonzentration in der Losung etwa $^{n}/_{10000}$, um 97%, wenn die Blausaurekonzentration in der Losung etwa $^{n}/_{1000}$ ist Im ersten Falle kommt an der Oberflache auf 400 Molekule Leucin 1 Molekul Blausäure, im zweiten Falle auf 75 Molekule Leucin 1 Molekul Blausaure Wir finden eine Hemmung der Oxalsäureoxydation um 63%, wenn die Blausaurekonzentration in der Losung etwa $^{n}/_{10000}$, um 80%, wenn die Blausaurekonzentration in der Lösung etwa $^{n}/_{1000}$ ist Im ersten Falle kommt an der Oberflache auf 120 Molekule Oxalsaure 1 Molekül Blausaure, im zweiten Falle auf 68 Molekule Oxalsäure 1 Molekul Blausäure

Es erscheint mir nicht moglich, diese Tatsachen anders zu erklaren. als daß an der Blutkohle katalytisch wirksame und katalytisch unwirksame Bezirke existieren

II.

Die fruher entwickelte Theorie, nach der die katalytisch wirksamen Bezirke der Blutkohle die schwermetallhaltigen Bezirke sind[1], erhalt durch folgende Versuche eine festere Stutze

Erhitzt man Blutkohle im Bombenrohr mit konzentrierter Salzsaure, so wird ein Teil des Schwermetalls aus der Kohle herausgelost Die zuruckbleibende schwermetallarmere Kohle adsorbiert Leucin, Oxalsaure und Blausaure noch gut Leucin und Oxalsaure verbrennen an ihrer Oberflache, doch wird dieser Vorgang durch Blausaure erheblich weniger gehemmt als an der Oberflache der nichtextrahierten Blutkohle

Andererseits kann man aus kristallisiertem Rohrzucker Kohle herstellen, die im wesentlichen reiner Kohlenstoff und im besonderen fast frei von Schwermetall ist Derartige Praparate adsorbieren Leucin, Oxalsaure und Blausaure gut Leucin und Oxalsaure verbrennen an ihrer Oberflache, doch wird diese Oxydation durch Blausaure nicht spezifisch[2] gehemmt

Eine kleine Tabelle mag diese Verhaltnisse illustrieren Mit v_1 ist der nach 60 Minuten beobachtete Sauerstoffverbrauch in der blausaurefreien Kontrolle bezeichnet, mit v_2 der Sauerstoffverbrauch unter

---

[1] WARBURG, O diese Zeitschr **119**, 134 1921, Zeitschr f Elektrochem. 1922, S. 70.

[2] „Spezifisch" nennen wir eine Hemmung, bei der die Menge an adsorbiertem Brennstoff — in diesem Falle an Leucin oder an Oxalsäure — nicht merklich vermindert ist.

sonst gleichen Bedingungen bei Gegenwart von Blausäure Die adsorbierte Blausäuremenge ist — worauf besonders hingewiesen sei — in allen Fällen gemessen und praktisch gleich gefunden worden

Kohlepräparat	mg Fe g Kohle	Leucin v_1/v_2	Oxalsäure v_1/v_2
Blutkohle (Versuch 1 u 2, Abschnitt VI) .	2,0	31	5
Blutkohle, extrahiert (Versuch 3 u 4, Abschnitt VI) .	0,4	7	2
Zuckerkohle (Versuch 5 u. 6, Abschnitt VI) .	0,02	1,6	1
Zuckerkohle (Versuch 7 u. 8, Abschnitt VI) .	0,005	1,1	1

III.

Fein verteilter, in Wasser suspendierter Kohlenstoff bindet Sauerstoff, wie Platinmetall, und gibt den gebundenen Sauerstoff beim Erhitzen als Sauerstoff, nach manchen Autoren in Kohlensäure, wieder ab In ausgesprochenem Maße hatte unsere aus Rohrzucker hergestellte Kohle die Eigenschaft, in Wasser suspendiert, Sauerstoff zu binden Selbst bei tagelangem Durchleiten von Sauerstoff durch eine bei 38° gehaltene Suspension hörte die Sauerstoffabsorption nicht völlig auf; sie wurde allmählich langsamer, stieg jedoch fast wieder auf ihren Anfangswert, wenn die Kohle gekocht und getrocknet wurde

Blutkohle dagegen bindet, in Wasser suspendiert, nur sehr geringe Mengen Sauerstoff. Wird sie jedoch im Bombenrohr mit Salzsäure erhitzt, dann säurefrei gewaschen und in Wasser suspendiert, so nimmt sie Sauerstoff mit ähnlicher Geschwindigkeit auf wie Zuckerkohle. (Versuch 9, Abschnitt VI)

Offenbar ist in der Blutkohle — die bis zu 10% Asche enthält[1] — der Kohlenstoff durch Salze vor Selbstoxydation geschützt Säure in der Hitze entfernt diese Salze teilweise und legt Kohlenstoff der Blutkohle frei Es tritt dann zu der katalytischen Wirkung des Schwermetalls eine katalytische Wirkung des Kohlenstoffs, zu einer durch Blausäure hemmbaren Wirkung eine durch Blausäure nicht hemmbare Wirkung.

Das beiden Katalysen Gemeinsame ist vermutlich nichts anderes als die Bindung — und damit die Aktivierung — des molekularen Sauerstoffs, sei es an Kohlenstoff, sei es an Schwermetall Daß Aminosäuren gegenüber aktiviertem Sauerstoff besonders empfindlich sind, kann man zeigen, wenn man Leucin und Wasserstoffsuperoxyd — in ver-

[1] Insbesondere fanden wir in unserem Präparat neben 0,2% Eisen etwa 9% Kieselsäure.

dunnter wasseriger Losung, bei schwach alkalischer Reaktion und bei Zimmertemperatur — zusammenbringt Das Leucin wird dann unter Desamidierung oxydiert (fur den Eintritt der Reaktion scheint nach Versuchen von Dr. RUDOLF MAYER nicht, wie man bisher wohl glaubte die Anwesenheit eines Katalysators erforderlich zu sein) Denkt man sich also den an Kohlenstoff oder an Schwermetall gebundenen Sauerstoff in ahnlicher Weise aktiviert wie im Wasserstoffsuperoxyd, so ist das Verhalten der Aminosäuren an Kohle auf bekannte chemische Vorgange zuruckgefuhrt

IV.

Die entwickelte Auffassung fuhrt zu einer praziseren Vorstellung uber die Wirkungsweise der Blausaure Blausäure hemmt, indem sie sich an das Schwermetall anlagert und dadurch die Bindung des Sauerstoffs an den Katalysator verhindert.

V.

Ich mochte an dieser Stelle mit einigen Worten auf Theorien eingehen, die H WIELAND[1] in den letzten Jahren über die Zellatmung veroffentlicht hat WIELAND geht weniger von den Tatsachen aus, die an atmenden Zellen gefunden worden sind, als von gewissen Vorstellungen, die er sich uber den Oxydationsverlauf organischer Molekule gebildet hat. Er glaubt nun, daß die Auffassung der Atmung als einer Eisenkatalyse mit seinen Vorstellungen in Widerspruch stehe, und lehnt deshalb die genannte Auffassung ab Dies geschieht in einer Form die irrefuhrt, und gegen die Einspruch erhoben werden muß

Die Theorie uber die Rolle des Eisens in der Zellatmung beruht auf der hundertfaltig erharteten Tatsache, daß lebende Zellen eine kleine Menge Eisen als lebenswichtigen Bestandteil enthalten sowie auf der Tatsache, daß es gelungen ist, durch Vermehrung des Eisengehalts einer Zelle die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in dem Maße zu steigern, als der naturliche Eisengehalt vermehrt wurde Beide Tatsachen werden von WIELAND verschwiegen Statt dessen gibt er als Fundament der Theorie den „problematischen" „Eisengehalt der Fermente" aus[2] und fuhrt als Argument gegen die Theorie an, daß ein aus Meerrettichwurzeln gewonnener Stoff, der die Reaktion zwischen Wasserstoffsuperoxyd und Pyrogallussaure beschleunigt, wahrscheinlich eisenfrei sei. Indessen kann dieser Umstand ebensowenig als Argument gegen

---

[1] WIELAND, H : Ergebn. d. Physiol 20, 477. 1922; Ber. d. d. chem. Ges. 55, 3639. 1922.

[2] Ergebn. d. Physiol., l. c., S. 502

die Theorie verwertet werden als der Umstand, daß irgendein anderer Stoff eisenfrei ist. —

Da WIELAND die katalytische Funktion des Eisens leugnet, so muß er auch die Theorie der Blausaurewirkung ablehnen Er tut dies, indem er — im Anschluß an O LOEW — eine eigene Theorie entwickelt[1] WIELAND nimmt an, daß in dem Atmungsvorgang Wasserstoffsuperoxyd entsteht, erlaubt jedoch diesem Oxydationsmittel nicht, daß es sich als solches in der Zelle betatigt, sondern laßt es durch „Katalase“ in Wasser und Sauerstoff gespalten werden Die Wirkung der Blausaure besteht nun nicht in einer Wirkung auf das „Atmungsenzym“, sondern in einer hemmenden Wirkung auf die Katalase, und erst durch das sich anhäufende giftige Wasserstoffsuperoxyd leidet die Zellatmung

Was erklart werden soll — die Wirkungsweise der Blausaure — wird hier zuruckgefuhrt auf einen Komplex umklarer Dinge, wie „Atmungsenzym“, „Vergiftung“ und „Leiden“ Was an der Theorie klar und faßbar ist, ist falsch Der respiratorische Quotient im Zustand der Blausaurehemmung zeigt nicht die von der Theorie verlangte Anomalie, daß mehr Sauerstoff verbraucht wird, als zur vollstandigen Oxydation der verbrennenden Stoffe erforderlich ist —

Vergebens suche ich nach einem sachlichen Grunde, aus dem heraus WIELAND die einfachen und naheliegenden Deutungen der Phanomene ablehnt Wir wissen, daß Schwermetalle oxydationskatalytisch wirken konnen (beispielsweise Kupfer bei der Sulfitoxydation, Kupfer bei der Cysteinoxydation) Wir wissen, daß Schwermetalle den Zerfall des Wasserstoffsuperoxyds beschleunigen konnen (beispielsweise Eisensalze, Platin) Wir wissen, daß Blausaure Schwermetallkatalysen hemmen kann (beispielsweise die Kupferkatalyse des Sulfits, die Kupferkatalyse des Cysteins, die Platinkatalyse des Wasserstoffsuperoxyds) Wir wissen schließlich, daß lebende Zellen Schwermetall als lebenswichtigen Bestandteil enthalten, und daß sowohl die Oxydation als auch die Wasserstoffsuperoxydzersetzung in lebenden Zellen durch Blausaure gehemmt werden

Selbst wenn die Versuche an Kohle und die Versuche am Seeigelei nicht vorlagen, so wurde die Reihe der aufgezahlten Tatsachen die Auffassung schon hinreichend begrunden, daß Atmung und Wasserstoffsuperoxydzersetzung in lebenden Zellen Schwermetallkatalysen sind, und daß die Blausaurewirkung in lebenden Zellen eine Antikatalyse in bezug auf Schwermetall ist —

Soviel uber einige spezielle Punkte der WIELANDschen Schriften Was WIELANDS Ausfuhrungen im allgemeinen anbetrifft, so erscheint

---

[1] Chem Ber , l. c., S. 3647

es mir nicht mehr zeitgemaß, den alten Streit HOPPE-SEYLERS und MORITZ TRAUBES, ob in der Atmung die Sauerstoffaktivierung oder die Wasserstoffaktivierung das Wesentliche sei, zu erneuern. Wir wissen heute, daß die Atmung eine Reaktion an Oberflachen ist Sowohl der Sauerstoff als auch die organischen Moleküle reagieren erst, nachdem sie an die Oberflachen der festen Zellbestandteile gebunden sind. An feste Oberflachen gebundene Molekule aber sind im allgemeinen reaktionsfahiger als frei bewegliche Moleküle im Gas- oder Losungsraum Wir haben also in der Zellatmung eine Reaktion zwischen „aktivierten" organischen Molekülen und zwischen „aktiviertem" Sauerstoff vor uns, und dies gilt ohne jede spezielle Hypothese über die chemische Natur des Adsorbens. Wie aber heute niemand mehr daruber diskutiert, ob bei der Knallgasreaktion an Glas oder bei der HABERschen Ammoniaksynthese der eine oder der andere Reaktionsteilnehmeer „aktiviert" ist, so sollte auch die Zellphysiologie nicht zum Schauplatz überlebter Kampfe werden

VI. Beschreibung der Versuche.

Die Messung der Oxydationsgeschwindigkeit geschah in fruher beschriebener Weise[1] nach der Druckmethode. Im Einsatz der Meßgefaße befand sich Kalilauge zur Absorption der entwickelten Kohlensaure Das Gesamtvolumen der Meßgefaße betrug etwa 30 ccm, das Volumen der eingefullten Flussigkeit 11 ccm, die Temperatur des Thermostaten war 37—38° Unter diesen Bedingungen zeigte 1 mm Druckabnahme den Verbrauch von etwa 1,8 ccm Sauerstoff an.

Die Messung der Adsorption geschah, indem die verschiedenen Stoffe vor Zugabe der Kohle und in den Kohlefiltraten titriert wurden, und zwar

Leucin nach SORENSENS[2] Formolmethode mit $^n/_5$ Barytlauge,

Oxalsaure mit $^n/_{10}$ Kalipermanganat,

Blausaure nach DENIGES[3] mit $^n/_{100}$ Silbernitrat, wobei zu 100 ccm Losung 2 ccm 25proz Ammoniakflussigkeit und 0,5 ccm 32proz Jodkalilosung gegeben wurden Titriert man in hohen Schichten auf schwarzer Unterlage, so konnen nach dieser schonen Methode selbst $^n/_{10000}$ Blausaurelosungen mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden

Mit x bezeichnen wir nach FREUNDLICH[4] die adsorbierte Substanzmenge in Millimolen, mit m die Kohlemenge in Grammen mit c die Konzentration in der Losung in Molen pro Liter die mit x Millimolen adsorbierter Substanz im Gleichgewicht ist

Bei Versuchen mit Blausaure muß stets berucksichtigt werden, daß sie selbst an der Kohleoberflache verbrennt[5], mit einer Geschwindigkeit, die in jeder Tabelle aus den fur reine Blausaurelosungen gegebenen Zahlen abgelesen werden kann

---

[1] WARBURG, O und E NEGELEIN diese Zeitschr 110, 72 1920.
[2] SORENSEN, ebendaselbst 7, 45. 1908
[3] CLASSEN: Theorie u Praxis d Maßanalyse, S. 655. Leipzig 1912.
[4] FREUNDLICH, H. Zeitschr. f physikal. Chem 57, 385. 1907.
[5] WARBURG, O. · diese Zeitschr. 119, 160 1921.

Dehnt man die Versuche so lange aus, bis alle Blausaure verbrannt ist, so ist auch die Wirkung der Blausaure verschwunden Wir haben hier ein lehrreiches und durchsichtiges Beispiel fur die „Erholung“ eines Katalysators von der Wirkung eines „Giftes“.

Die Herstellung der Zuckerkohle geschah, indem 100 g kristallisierten Rohrzuckers, mit 30 g Kaliumkarbonat vermischt, in kleinen Portionen in einen schwach glühenden Porzellantiegel eingetragen wurden. Nach jedesmaligem Eintragen wurde gewartet, bis die Gasentwicklung schwach geworden war, und erst dann weitere Substanz zugefugt War auf diese Weise die gesamte Substanzmenge verkohlt, so wurde mittels eines starken Geblases noch eine halbe Stunde auf Rotglut erhitzt. Dann wurde die Masse gepulvert, in einem Quarzkolben mit eisenfreier, in Porzellanflaschen aufbewahrter Salzsaure ausgekocht, schließlich mit metallfreiem destillierten Wasser saurefrei gewaschen und bei 120° getrocknet Die Ausbeute betrug etwa 16 g Kohle aus 100 g Rohrzucker

Extrahiert man nicht mit Salzsaure, sondern mit Wasser, so erhalt man Praparate, die viel eisenreicher sind. Aber nur ein kleiner Teil dieses Eisens ist mit der Kohle fest verbunden, die Hauptmenge ist der Kohle beigemengtes Eisen, das nicht katalytisch wirksam ist.

Die Eisenbestimmung in den Kohlepräparaten geschah in fruher beschriebener Weise[1] nach der kolometrischen Methode von LACHS und FRIEDENTHAL[2], in der silicathaltigen Blutkohle nach Aufschluß der Asche mit Carbonat.

Die verwendete Blutkohle war in allen Fallen „Carbo medizinalis Merck, hochwertig, biologisch gepruft“.

Versuch 1. (Leucin und Blausaure an Blutkohle.) Je 2 g Blutkohle wurden mit 100 ccm Losung vermischt Je 10 ccm der so erhaltenen Suspension dienten zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit, der Rest zur Messung der Adsorption.

Adsorptionsmessungen.

Reine Leucinlosung.

20 ccm vor Zugabe der Kohle 5,11 ccm $^n/_5$ Barytlauge
20 ccm Kohlefiltrat 3,50 ccm $^n/_5$ Barytlauge

$$x/m = 8,6 \times 10^{-1}, \quad c = 3,5 \times 10^{-2}$$

Gemisch von Leucin und Blausaure

20 ccm vor Zugabe der Kohle: 5,12 ccm $^n/_5$ Barytlauge.
20 ccm Kohlefiltrat: 3,60 ccm $^n/_5$ Barytlauge

$$\left.\begin{aligned} x/m &= 7,6 \times 10^{-1}\,\mathrm{g} \\ c &= 3,6 \times 10^{-2}\,\mathrm{g} \end{aligned}\right\} \text{Leucin}$$

50 ccm vor Zugabe der Kohle. 2,5 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$
50 ccm Kohlefiltrat. 2,0 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$.

$$\left.\begin{aligned} x/m &= 1,0 \times 10^{-2}\,\mathrm{g} \\ c &= 8,0 \times 10^{-4}\,\mathrm{g} \end{aligned}\right\} \text{Blausaure.}$$

Reine Blausaurelosung.

50 ccm vor Zugabe der Kohle. 2,4 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$.
50 ccm Kohlefiltrat: 1,7 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$

$$x/m = 1,4 \times 10^{-2}, \quad c = 6,8 \times 10^{-4}.$$

---

[1] WARBURG, O . diese Zeitschr. **119**, 163. 1921.
[2] LACHS und FRIEDENTHAL, ebendaselbst **32**, 130 1911.

Oxydationsgeschwindigkeit des Leucins
38°. Gasraum Luft.

	1	2	3	4	3—1 $= v_1$	4—2 $= v_2$	v_1 v_2
mg Kohle .	200	200	200	200			
+ 10 ccm (Konzentration der zugesetzten Losungen)	H_2O	10^{-3} n Blausaure	5×10^{-2} n Leucin	5×10^{-2} n Leucin 10^{-3} n Blausaure			
Anfangsbedingungen, aus den Adsorptionsmessungen berechnet							
c (Leucin) . .	—	—	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$			
c (Blausaure)	—	$6,8 \times 10^{-4}$	—	$8,0 \times 10^{-4}$			
x (Leucin) .	—	—	$1,6 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$			
x (Blausaure) .	—	$2,8 \times 10^{-3}$	—	$2,0 \times 10^{-3}$			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min . .	—	2	41	4	*41*	—	—
40 ..	4	6	105	8	*101*	*2*	—
60 .	6	8	192	14	*186*	*6*	*31*
80 .	7	12	290	20	*283*	*8*	*35*
105 .	8	17	451	29	*443*	*12*	*37*

Versuch 2. (Oxalsaure und Blausaure an Blutkohle.) Je 2 g Blutkohle wurden mit 100 ccm Losung vermischt Je 10 ccm der so erhaltenen Suspensionen dienten zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit, der Rest zur Messung der Adsorption

Adsorptionsmessungen.

Reine Oxalsaurelosung.

20 ccm vor Zugabe der Kohle: 3,20 ccm $^n/_{10}$ $KMnO_4$
20 ccm Kohlefiltrat 1,25 ccm $^n/_{10}$ $KMnO_4$.

$x/m = 2,4 \times 10^{-1}$, $c = 3,13 \times 10^{-3}$

Gemisch von Oxalsaure und Blausaure

20 ccm vor Zugabe der Kohle 3,20 ccm $^n/_{10}$ $KMnO_4$
20 ccm Kohlefiltrat 1,20 ccm $^n/_{10}$ $KMnO_4$

$x/m = 2,5 \times 10^{-1}$, $c = 3,0 \times 10^{-3}$

50 ccm vor Zugabe der Kohle 3,2 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$.
50 ccm Kohlefiltrat 2,67 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$

$x/m = 1,06 \times 10^{-2}$, $c = 1,07 \times 10^{-3}$.

Reine Blausaurelosung

50 ccm vor Zugabe der Kohle: 3,1 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$.
50 ccm Kohlefiltrat: 2,5 ccm $^n/_{100}$ $AgNO_3$.

$x/m = 1,2 \times 10^{-2}$, $c = 1,0 \times 10^{-3}$.

Oxydationsgeschwindigkeit der Oxalsaure
38°. Gasraum Luft.

	1	2	3	4	3 — 1 $= v_1$	4 — 2 $= v_2$	v_1/v_2
mg Kohle	200	200	200	200			
— 10 ccm (Konzentrationen der zugesetzten Losungen) . . .	Wasser	1,2 × 10^{-3} n Blausaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure 1,2 × 10^{-3} n Blausaure			
Anfangsbedingungen, aus den Adsorptionsmessungen berechnet							
c (Oxalsaure).	—	—	3,1 × 10^{-3}	3,0 × 10^{-3}			
c (Blausaure).	—	1 × 10^{-3}	—	1,1 × 10^{-3}			
x (Oxalsäure)	—	—	4,8 × 10^{-2}	5,0 × 10^{-2}			
x (Blausaure). . .	—	2,4 × 10^{-3}	—	2,0 × 10^{-3}			
Verbrauchte cmm O_2 nach 20 Min.	—	6,6	52	14	*52*	*6*	(8,7)
40 „	4	13	116	32	*111*	*19*	*5,8*
70 „	6	21	213	60	*207*	*39*	*5,3*
100 „	8	28	300	90	*298*	*62*	*4,8*

Versuch 3. (Oxalsaure-Blausaure an mit Saure extrahierter Blutkohle.) 5 g Blutkohle wurden mit 30 ccm konzentrierter Salzsaure im Bombenrohr eingeschlossen und 20 Stunden auf 150° erhitzt. Weiterbehandelt wie Zuckerkohle. Zur Eisenbestimmung wurde 1 g verascht. Gefunden 0,4 mg Eisen.

Adsorption der Blausaure. 100 ccm Blausaurelosung, 2 g Kohle

50 ccm vor Zugabe der Kohle 2,75 ccm $^{n}/_{100}$ $AgNO_3$

50 ccm Kohlefiltrat 2,10 ccm $AgNO_3$

An 1 g Kohle 0,65 ccm $AgNO_3$

Ein Vergleich mit Versuch 1 und 2 zeigt, daß das Adsorptionsvermogen gegenuber Blausaure durch die Extraktion nicht merklich abgenommen hat.

Oxydationsgeschwindigkeit der Oxalsaure
38°. Gasraum Luft

	1	2	3	4	3 — 1 $= v_1$	4 — 2 $= v_2$	v_1/v_2
mg Kohle	200	200	200	200			
+ 10 ccm .	Wasser	10^{-3} n Blausaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure 10^{-3} n Blausaure			
Verbrauchte cmm O_2 nach 20 Min	23	21	57	44	*34*	*23*	*1,5*
40 „ . . .	37	33	113	73	*76*	*40*	*1,9*
60	44	39	161	98	*117*	*59*	*2,0*
80 .	51	48	209	124	*158*	*76*	*2,1*
100	56	54	262	151	*206*	*97*	*2,1*
120 . .	63	61	311	176	*248*	*115*	*2,2*

Versuch 4. (Leucin-Blausäure an mit Säure extrahierter Blutkohle.) Zu dem Versuch wurde dasselbe Kohlepräparat benutzt wie zu Versuch 3

Oxydationsgeschwindigkeit des Leucins
38°. Gasraum Luft.

	1	2	3	4	3 — 1 = v_1	4 — 2 = v_2	v_1/v_2
mg Kohle . .	200	200	200	200			
+ 10 ccm	Wasser	10^{-3} n Blausäure	5 × 10^{-2} n Leucin	5 × 10^{-2} n Leucin 10^{-3} n Blausäure			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min.	7	3,5	48	12	*41*	*8,5*	4,8
40 „	12,4	7,1	102	22	*90*	*15*	6,0
60 „ . . .	16	10,6	162	31	*146*	*20,4*	7,2
80 „ . . .	19,4	12,4	228	43	*209*	*30,4*	7,1

Versuch 5 (Oxalsäure-Blausäure an Zuckerkohle.) Das Kohlepräparat enthielt pro Gramm 0,021 mg Eisen.

Oxydationsgeschwindigkeit der Oxalsäure.
38°. Gasraum Luft

	1	2	3	4	3 — 1 = v_1	4 — 2 = v_2	v_1/v_2
mg Kohle	200	200	200	200			
+ 10 ccm	Wasser	10^{-3} n Blausäure	8 × 10^{-3} n Oxalsäure	8 × 10^{-3} n Oxalsäure 10^{-3} n Blausäure			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min	42	43	80	81	*38*	*38*	*1*
40 „	72	74	138	138	*66*	*64*	*1*
60 „	97	98	186	188	*89*	*90*	*1*
80 „	116	120	235	237	*119*	*117*	*1*

Versuch 6 (Leucin und Blausäure an Zuckerkohle.) Zu dem Versuch wurde dasselbe Präparat verwendet wie zu Versuch 5

Oxydationsgeschwindigkeit des Leucins
38° Gasraum Luft

	1	2	3	4	3 — 1 = v_1	4 — 2 = v_2	v_1/v_2
mg Kohle . .	200	200	200	200			
+ 10 ccm . . .	Wasser	10^{-3} n Blausäure	5 × 10^{-2} n Leucin	5 × 10^{-2} n Leucin 10^{-3} n Blausäure			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min.	40,5	40	64	56	*23*	*16*	*1,4*
40 „	67	71	120	104	*53*	*33*	*1,6*
60	92	95	172	144	*80*	*49*	*1,6*
80 „	111	115	225	186	*114*	*71*	*1,6*

Versuch 7. (Oxalsaure-Blausaure an Zuckerkohle.) Das Kohlepraparat enthielt 0,005 mg Eisen pro Gramm.

Um die Selbstoxydation zu verlangsamen, war es in Wasser suspendiert, 16 Stunden bei 38° mit Luft behandelt worden. Es wurde dann, ohne es wieder zu trocknen, zum Versuch verwendet.

Adsorption der Blausaure 100 ccm Blausaurelosung, 2 g Kohle

50 ccm vor Zugabe der Kohle. 2,8 ccm $^{n}/_{100}$ $AgNO_3$.
50 ccm Kohlefiltrat. 1,9 ccm $^{n}/_{100}$ $AgNO_3$
An 1 g Kohle: 0,9 ccm $^{n}/_{100}$ $AgNO_3$.

Ein Vergleich mit Versuch 1 und 2 zeigt, daß Blausaure ebensogut adsorbiert wird wie von Blutkohle.

Adsorption der Oxalsaure 100 ccm Oxalsaurelosung, 2 g Kohle.

20 ccm vor Zugabe der Kohle 3,1 ccm $^{n}/_{10}$ $KMnO_4$
20 ccm Kohlefiltrat: 1,3 ccm $^{n}/_{10}$ $KMnO_4$.
An 0,4 g Kohle: 1,8 ccm $^{n}/_{10}$ $KMnO_4$.

Ein Vergleich mit Versuch 2 zeigt, daß Oxalsaure ebensogut adsorbiert wird wie von Blutkohle.

Oxydationsgeschwindigkeit der Oxalsaure.
38° Gasraum Luft.

	1	2	3	4	3—1 = v_1	4—2 = v_2	v_1/v_2
mg Kohle	200	200	200	200			
+ 10 ccm	Wasser	10^{-3} n Blausaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure	8 × 10^{-3} n Oxalsaure 10^{-3} n Blausaure			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min.	3,5	3,5	44	46	*40*	*42*	*1*
40 „	7	8	90	95	*83*	*87*	*1*
60 „	9	11,5	136	144	*127*	*132*	*1*

Versuch 8. (Leucin-Blausaure an Zuckerkohle.) Zum Versuch wurde dasselbe (in gleicher Weise vorbehandelte) Präparat verwendet wie zu Versuch 7

Adsorption des Leucins. 100 ccm Leucinlosung, 2 g Kohle.

20 ccm vor Zugabe der Kohle 5,4 $^{n}/_{5}$ Barytlauge
20 ccm Kohlefiltrat: 4,5 ccm $^{n}/_{5}$ Barytlauge
An 0,4 g Kohle: 0,9 ccm $^{n}/_{5}$ Barytlauge

Ein Vergleich mit Versuch 1 zeigt, daß Leucin schlechter adsorbiert wird als von Blutkohle (während Blausäure und Oxalsäure, nach Versuch 7, von demselben Präparat ebensogut adsorbiert werden wie von Blutkohle).

Oxydationsgeschwindigkeit des Leucins.
38°. Gasraum Luft.

	1	2	3	4	3—1 = v_1	4—2 = v_2	v_1/v_2
mg Kohle	200	200	200	200			
+ 10 ccm	Wasser	10^{-3} n Blausaure	3,0 × 10^{-2} n Leucin	3,0 × 10^{-2} n Leucin 10^{-3} n Blausaure			
Verbrauchte cmm O_2 nach							
20 Min.	—	—	21	22	*21*	*22*	1
40 „	2	5	46	46	*44*	*41*	1,1
60 „	4	8	78	74	*74*	*61*	1,1

Versuch 9 (Bindung von Sauerstoff durch verschiedene Kohlepräparate.)

38°. Gasraum Luft

mg Kohle . .	200	200	200	200
ccm Wasser . . .	10	10	10	10
Kohlepraparat.	Blutkohle	Blutkohle m Salzsaure bei 150° extrahiert	Zuckerkohle	Zuckerkohle 16 Std. bei 38° mit Luft vorbehandelt
Verbrauchte cmm O_2 nach				
20 Min . .	—	*23*	*23*	3,5
40 „ .	2	*37*	*42*	7
60 „	3,5	*44*	*56*	9

Biochem Zeitschr. 142, 493. 1923.

Über die Reaktionsfähigkeit verschiedener Aminosäuren an Blutkohle sowie gegenüber Wasserstoffsuperoxyd.

Von

Erwin Negelein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 18. September 1923.)

Mit 2 Abbildungen.

Bringt man Blutkohle[1] mit aquimolekularen Losungen verschiedener Aminosäuren ins Adsorptionsgleichgewicht und mißt die Sauerstoffmengen, die pro Gramm Kohle und Minute aufgenommen werden, so findet man große Unterschiede Beispielsweise verbraucht Kohle, im Gleichgewicht mit einer etwa zehntausendstel normalen Leucinlosung, in einer bestimmten Zeit mehr als 50mal soviel Sauerstoff, als im Gleichgewicht mit einer ebenso konzentrierten Glykokollosung Es liegt nahe, die Erklarung in der Verschiedenheit der Adsorptionskonstanten zu suchen und anzunehmen, daß die Unterschiede kleiner werden, moglicherweise sogar verschwinden, wenn man die Oxydationsgeschwindigkeit nicht auf die Konzentrationen in der Losung, sondern auf die adsorbierten Substanzmengen bezieht Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich es, auf Vorschlag von Herrn WARBURG, unternommen, das Verhalten verschiedener Aminosauren an Kohle zu vergleichen[2]

I. Die Versuchsanordnung.

Messung des Sauerstoffverbrauchs 0,4 g Kohle (MERCKS „Tierblutkohle“) wurden mit 10 ccm Aminosaurelösung ubergossen und in den Atmungstrog (Abb. 1) bei *F* eingefullt In dem Einsatz *E* des Troges befand sich 1 ccm 5proz. Kalilauge

Der Trog wurde mit einem Barcroftmanometer verbunden und, nachdem sein Gasraum mit Sauerstoff gefullt war, im Thermostaten

---

[1] WARBURG, O. und E. NEGELEIN diese Zeitschr. 113, 257. 1921.

[2] Vorversuche zu dieser Arbeit hat Herr Dr. R. MAYER ausgefuhrt.

auf oft beschriebene Art[1] geschüttelt. Bezeichnen wir die beobachtete Druckänderung mit h, die „Gefäßkonstante für Sauerstoff" mit K_{O_2}, so ist der Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimetern

$$v = h K_{O_2}. \tag{1}$$

Das Gesamtvolumen des Troges war etwa 30 ccm, das Volumen der eingefüllten Flüssigkeiten nach dem Gesagten 11 ccm, woraus sich K_{O_2} für 20° zu etwa 1,8 berechnet. 1 mm Druckänderung zeigte also den Verbrauch von 1,8 mm Sauerstoff an.

Abb. 1.

Die Versuchszeit betrug einige Stunden. Innerhalb dieser Zeit wurde nur ein kleiner Teil der in dem Troge befindlichen Aminosäure oxydiert, so daß die Konzentration und die adsorbierte Menge der Aminosäure während der Messung als konstant betrachtet werden konnte. In Übereinstimmung hiermit war die Oxydationsgeschwindigkeit $\frac{dv}{dt}$ innerhalb der Versuchszeit im allgemeinen konstant.

Im Falle des Leucins trat eine Komplikation auf. Hier war $\frac{dv}{dt}$ anfangs klein und stieg allmählich auf einen Wert an, der dann für einige

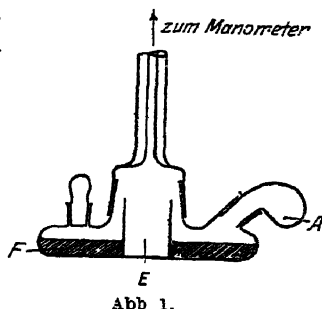



Tabelle 1

400 mg Kohle + 10 ccm n/20 (dl) Leucin (Isobutylaminoessigsäure)

38°			20°		
t Min.	v cmm	$\frac{dv}{dt}$	t Min.	v cmm	$\frac{dv}{dt}$
20	210	10,5	20	20	1,0
42	562	16,0	40	39	0,95
56	837	19,6	60	59	1,0
70	1132	21,1	80	85	1,3
85	1456	21,6	100	114	1,45
100	1780	21,6	120	147	1,65
115	2094	20,9	140	184	1,85
130	2398	20,3	160	225	2,05
			180	268	2,15
			200	314	2,3
			220	364	2,5
			240	413	2,45

[1] Warburg, O.: diese Zeitschr. 142, 317. 1923. Neben der Thermobarometerkontrolle ist hier noch eine Kohle-Wasserkontrolle notwendig, durch die die „Selbstoxydation" der Kohle eliminiert wird.

Stunden, bis sich der Verbrauch an Substanz bemerkbar machte, konstant blieb. Zum Beleg teile ich zwei Versuche mit, von denen einer bei 38°, der andere bei 20° ausgeführt worden ist.

Wir sehen aus der Tabelle 1, daß bei 20° sowohl als auch bei 38° die Oxydationsgeschwindigkeit allmählich ansteigt. Bei 38° ist sie nach einer Stunde, bei 20° nach drei Stunden konstant geworden. Bei 38° sind am Ende der Induktionsperiode 1100 cmm, bei 20° 340 cmm Sauerstoff verbraucht. v für $t = \infty$ beträgt etwa 15000 cmm. Bei 38° ist die Induktionsperiode beendigt, wenn 7%, bei 20°, wenn 2% des Leucins oxydiert sind. Will man also — was ich immer getan habe — die Induktionsperiode ausschalten, so ist es günstiger, bei 20° als bei 38° zu arbeiten.

Messung der Adsorption. Kohle und Aminosäurelösung wurden in gleichen Verhältnissen wie zum Oxydationsversuch gemischt und 10 Minuten geschüttelt. Dann wurde filtriert und die Aminosäure mit n/5 Natronlauge nach SÖRENSENS[1] Formolmethode titriert. Man erfuhr so die beim Oxydationsversuch herrschenden Anfangsbedingungen, die Konzentration in der Lösung c_0 und die adsorbierte Menge x_0 für $t = 0$. Bei der Kürze der Versuche konnten diese Werte ohne merklichen Fehler für die ganze Dauer der Versuche eingesetzt werden.

II. Die Adsorption der Aminosäuren an Blutkohle.

Die Beziehung zwischen der adsorbierten Menge x und der Konzentration c einer Aminosäure läßt sich nach ABDERHALDEN und FODOR[2] für kleine Werte von c ausdrücken durch die Beziehung

$$\frac{x}{m} = k c\,, \tag{2}$$

wo m die Menge der Kohle, k eine Konstante bedeutet.

In der Tat wird die Adsorptionsisotherme, wenn man zu sehr kleinen Belegungsdichten heruntergeht, nahezu eine gerade Linie. Bezeichnen wir als Belegungsdichte das Verhältnis

$$\frac{\text{Millimole adsorb. Substanz}}{\text{Gramme Kohle}},$$

so ist für Belegungsdichten von einigen $^1/_{100}$ Millimolen an abwärts Gleichung (2) brauchbar. Ich habe für Belegungsdichten dieser Größenordnung die Adsorption verschiedener Aminosäuren gemessen und dabei die folgenden k-Werte erhalten.

---

[1] SÖRENSEN: diese Zeitschr. 7, 45. 1908.

[2] ABDERHALDEN u. FODOR: Zeitschr. f. Fermentforsch. 2, 74. 1917; 2, 151. 1918.

Tabelle 2.

$$20^0.\quad k = \frac{x}{m \cdot c}\left[\frac{\text{Millimole}}{\textit{Gramme} \times \textit{Mole/Liter}}\right].$$

Aminosäure	Formel	k
Amino-Essigsäure	$CH_2NH_2.COOH$	3,0
Amino-Propionsäure (d, l) . .	$CH_3.CHNH_2.COOH$	2,8
n-Amino-Buttersäure (d, l) . .	$CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH$	7,5
Iso-Amino-Buttersäure . . .	$(CH_3)_2.CNH_2.COOH$	9,2
Iso-Amino-Valeriansäure (d, l). .	$(CH_3)._2CH\ CHNH_2.COOH$	19
Iso-Amino-Capronsäure (d, l) . .	$(CH_3)_2.CH.CH_2.CHNH_2.COOH$	60
Iso-Amino-Capronsäure (l)	dasselbe	81
n-Amino-Capronsäure .	$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CHNH_2.COOH$	200

III. Die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle.

Wie das Adsorptionsgleichgewicht, so wird auch die Kinetik der Oxydation nur dann durch einfache Beziehungen dargestellt, wenn die Belegungsdichten sehr klein sind. Für Belegungsdichten von einigen $^1/_{100}$ Millimolen an abwärts findet man, daß

$$\frac{dv}{dt} = \alpha x, \qquad (3)$$

wo α eine Konstante bedeutet und, da die Bedingung der Gleichung (2) gilt,

$$\frac{dv}{dt} = \alpha k m c, \qquad (4)$$

also Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit einerseits und adsorbierter Menge und Konzentration andererseits.

Abb. 2. (Abszisse: Belegungsdichte. Ordinate: Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimetern pro Minute und Gramm Kohle.)

Geht man zu größeren Belegungsdichten über, so gelten diese einfachen Beziehungen nicht mehr; der Ausdruck $\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$ der Gleichung (3) ist dann nicht mehr konstant, sondern wird mit wachsender Belegungsdichte kleiner und kleiner, ein Verhalten, das die Kurve der Abb. 2 an dem Beispiel der n-Aminobuttersäure zeigt.

Unter diesen Umständen wird man, will man die Oxydationsgegeschwindigkeit pro Mol adsorbierter Substanz für verschiedene Aminosäuren vergleichen, $\frac{dv}{dt}$ für gleiche Belegungsdichten oder — noch besser — für sehr kleine Belegungsdichten messen, in einem Gebiet, in dem

die Beziehung der Gleichung (3) gilt. Dann kommt die in der Einleitung gestellte Aufgabe darauf hinaus, die α-Werte der Gleichung (3) für verschiedene Aminosäuren zu bestimmen, also $\frac{dv}{dt}$ und x für sehr kleine Belegungsdichten zu messen. Die Schwierigkeit hierbei ist die Messung von x, denn wenn die Belegungsdichten klein sein sollen, so müssen es auch die Ausschläge bei der Formoltitration sein. Ich bin mit den Belegungsdichten so weit heruntergegangen, als die Methode der Adsorptionsmessung es erlaubte, und habe mich dabei dem Gebiete, in dem die Gleichungen (2) und (3) gelten, soweit als möglich genähert, es im allgemeinen jedoch nicht erreicht und muß deshalb meine α-Werte als Näherungswerte betrachten.

Mein Beobachtungsmaterial teile ich in den Protokollen 1 bis 9 am Schluß dieser Arbeit mit. In der ersten Horizontalspalte stehen die adsorbierten Mengen x, die, durch die Kohlemenge dividiert, die Belegungsdichten ergeben, in der zweiten Horizontalspalte die Gleichgewichtskonzentrationen c in der Lösung. Es folgen die zusammengehörenden Werte von t und v, aus denen — unter Ausschluß der Induktionszeit — $\frac{dv}{dt}$ berechnet wurde, und schließlich in der letzten Horizontalspalte die Quotienten $\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$. Die Belegungsdichte nimmt in den Protokollen von links nach rechts zu und man erkennt, wie mit wachsender Belegungsdichte $\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$ im allgemeinen abnimmt. In zwei Fällen scheint $\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$ ein Maximum zu zeigen, doch handelt es sich hier um Abweichungen innerhalb der Fehlergrenze.

Die niedrigsten Belegungsdichten meiner Versuche liegen um $6 \cdot 10^{-2} \left[\frac{\text{Millimole}}{\text{Gramme}}\right]$. Bildet man die α-Werte für die niedrigsten Belegungsdichten und rechnet sie durch eine geringfügige Interpolation auf die Belegungsdichte $6 \cdot 10^{-2}$ um, so erhält man das Bild der folgenden Tabelle 3.

Aus der Tabelle 3 ersehen wir, daß für Aminosäuren mit der Gruppe CH_2NH_2 und $CHNH_2$ α zwischen 8,2 und 17 liegt, das sind, wenn man die Unterschiede der unter k stehenden Adsorptionskonstanten damit vergleicht, relativ enge Grenzen. Der Mittelwert von α ist 12,3, was

Tabelle 3. *Belegungsdichte 6·10⁻². 20°.*

Aminosäure	Formel	α	k
Amino-Essigsäure	$CH_2NH_2.COOH$	10,5 (± 1,8)	3,0
Amino-Propionsäure (d, l)	$CH_3.CHNH_2.COOH$	8,2 (± 1,5)	2,8
n-Amino-Buttersäure (d, l)	$CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH$	10,7 (± 1,5)	7,5
Iso-Amino-Buttersäure	$(CH_3)_2.CNH_2.COOH$	*0,6* (± 1,3)	9,2
Iso-Amino-Valeriansäure (d, l)	$(CH_3)_2.CH.CHNH_2.COOH$	8,9 (± 1,5)	19
Iso-Amino-Capronsäure (d, l)	$(CH_3)_2.CH.CH_2.CHNH_2.COOH$	16,1 (± 1,5)	60
Iso-Amino-Capronsäure (l)	dasselbe	14,6 (± 1,4)	81
n-Amino-Capronsäure (d, l)	$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CHNH_2.COOH$	17,0 (± 1,2)	200

bedeutet, daß ein Millimol Aminosäure — bei einer Belegungsdichte von $6 \cdot 10^{-2}$ und einer Temperatur von 20° — pro Minute an der Kohleoberfläche etwa 12,3 cmm Sauerstoff verbraucht. Die großen Unterschiede der Oxydationsgeschwindigkeit, die man findet, wenn man Kohle mit äquimolekularen Lösungen verschiedener Aminosäuren ins Gleichgewicht bringt, beruhen also im wesentlichen auf den Unterschieden der Adsorptionskonstanten. Man erkennt daraus eine Wirkung der Oberflächenkräfte, auf die ich die Aufmerksamkeit besonders lenken möchte: weit entfernt davon, daß sie auf den chemischen Umsatz nivellierend wirken — wie THUNBERG[1] und WIELAND[2] glauben —, wirken sie im Gegenteil eminent spezifizierend.

Ganz aus der Reihe heraus fällt der Wert für die tertiäre[3] Aminobuttersäure mit 0,6 gegenüber 10,7 für die isomere sekundäre Säure. Ähnlich verhält sich die tertiäre Aminocapronsäure (Protokoll Nr. 9), die in Tabelle 3 nicht aufgenommen ist, weil ich über keinen Versuch mit der Belegungsdichte $6 \cdot 10^{-2}$ verfüge. Vergleichen wir aber den Versuch des Protokolls Nr. 9, bei dem die Belegungsdichte $50 \cdot 10^{-2}$ ist, mit einem Versuche ähnlicher Belegungsdichte des Protokolls Nr. 8 (n-Aminocapronsäure), so sehen wir, daß sich die α-Werte wie 0,32 : 6,5 oder wie 1 : 20 verhalten. Aminosäuren mit der Gruppe CH_2NH_2 oder $CHNH_2$ sind also an Kohle bedeutend reaktionsfähiger als Aminosäuren mit der Gruppe $\genfrac{}{}{0pt}{}{R}{R}{>}CHN_2$.

---

[1] THUNBERG, TORSTEN in Hammarsten, Physiol. Chem. S. 705. 1922.

[2] WIELAND, H. in Oppenheimers Handbuch d. Biochem., 2. Aufl., 2, 258. 1923.

[3] Man unterscheidet die Aminosäuren, je nachdem das C-Atom, das die NH_2-Gruppe trägt, an ein, zwei oder drei C-Atome gebunden ist, als „primäre", „sekundäre" und „tertiäre".

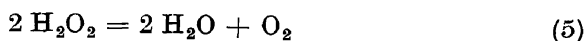
IV. Die Oxydation der Aminosäuren durch Wasserstoffsuperoxyd.

Nach einer Theorie von WARBURG beruht die oxydationskatalytische Wirkung der Blutkohle in erster Linie auf einer Aktivierung des Sauerstoffs durch die Blutkohle

Diese Theorie legte es nahe, die Wirkung der Blutkohle auf Aminosäuren mit der Wirkung aktivierten Sauerstoffs auf Aminosauren zu vergleichen Ich habe das getan und als aktivierten Sauerstoff Wasserstoffsuperoxyd gewahlt, von dem man durch die Arbeiten von NEUBERG[1] und DAKIN[2] weiß, daß es Aminosauren bei Zimmertemperatur oxydativ desamidiert

Vorversuche ergaben, daß Wasserstoffsuperoxyd Aminosauren besonders leicht unter Bedingungen angreift, unter denen es selbst instabil ist Bei saurer und neutraler Reaktion sind verdunnte Wasserstoffsuperoxydlosungen relativ stabil und reagieren nicht merklich mit Aminosauren. Bei alkalischer Reaktion dagegen ist Wasserstoffsuperoxyd in verdunnter Losung instabil[3] und oxydiert Aminosauren unter Abspaltung von Ammoniak.

Eine fur Messungen geeignete Wasserstoffionenkonzentration ist $10^{-9,2}$ die ich mir durch Vermischen von 85 Teilen molarer Natriumbicarbonat- und 15 Teilen molarer Natriumcarbonatlösung herstellte, ein Gemisch von großer Resistenz in bezug auf H-Ionenverschiebung In 1 Liter dieses Gemisches loste ich 17,5 Millimole Aminosaure und 10 Millimole Wasserstoffsuperoxyd[4] und brachte sie bei 38° zur Reaktion Nach etwa 4 Stunden war dann, wie ich mittels Titansaure feststellen konnte, das Wasserstoffsuperoxyd verschwunden, zum Teil durch Reaktion mit der Aminosaure, zum Teil durch Reaktion nach der Gleichung

$$2\,H_2O_2 = 2\,H_2O + O_2 \qquad (5)$$

Wieviel Wasserstoffsuperoxyd hierbei mit der Aminosaure in Reaktion getreten, wieviel nach Gleichung (5) zerfallen war, ließ sich auf folgende Weise ermitteln:

In den Atmungstrog (Abb 1) wurden 10 ccm des aminosaurehaltigen Carbonatgemisches eingefullt, in den Anhang A 0,5 ccm

---

[1] NEUBERG Beitr z. chem. Physiol. u. Path 2, 238 1902; diese Zeitschr 20, 531. 1909.

[2] DAKIN: Journ. of biol. Chem 4, 63 1909.

[3] Die Frage, ob die Oxydation der Aminosäuren durch Wasserstoffsuperoxyd und der Zerfall des Wasserstoffsuperoxyds selbst Metallkatalysen sind, lasse ich hier als noch unentschieden beiseite.

[4] Das Wasserstoffsuperoxyd wurde aus Natriumsuperoxyd und primarem Natriumphosphat nach W. FRIEDERICH (vgl. VANINO, Präparative Chem. 1, 10. 1921) hergestellt und im Vakuum destilliert.

Wasserstoffsuperoxydlösung. Nachdem der Trog mit einem Barcroftmanometer verbunden und in einen auf 38° einstehenden Thermostaten gebracht war, wurde geschüttelt, bis Temperaturgleichgewicht eingetreten war. Dann wurde der Inhalt des Anhangs in das Carbonatgemisch eingekippt, der Anhang mehrmals durch Neigen des Troges mit Carbonatgemisch nachgespült und so lange geschüttelt, bis der am Manometer erscheinende positive Druck nicht mehr zunahm, die Sauerstoffentwicklung also beendet war.

Der beobachtete Enddruck, multipliziert mit der „Gefäßkonstante für Sauerstoff", ergab die nach Gleichung (5) entwickelte Sauerstoffmenge v in Kubikmillimetern, und v, multipliziert mit 0,089, die nach Gleichung (5) zerfallene Wasserstoffsuperoxydmenge in Mikromolen. Verbrauchte die Aminosäure Wasserstoffsuperoxyd, so war v kleiner als die Sauerstoffmenge a, die gemäß Gleichung (5) dem zugesetzten Wasserstoffsuperoxyd äquivalent war, die Differenz $(a - v)$ ergab den Sauerstoffverbrauch, $(a - v)$ 0,089 den Wasserstoffsuperoxydverbrauch der Aminosäure.

Mit Hilfe dieser einfachen Anordnung ließ sich in jedem Falle nicht nur feststellen, ob eine Substanz Wasserstoffsuperoxyd verbrauchte, sondern auch ein Urteil über die Geschwindigkeit gewinnen, mit der dies geschah. Je größer nämlich $a - v$, um so größer ist auch die Geschwindigkeit, mit der das Wasserstoffsuperoxyd verbraucht wird, und sind die $(a - v)$-Werte für verschiedene Substanzen gleich, so sind es auch die Geschwindigkeiten des Wasserstoffsuperoxydverbrauchs. Doch stehen die $(a - v)$-Werte *nicht* — worauf ich besonders hinweisen möchte — im Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten.

Eine Versuchsreihe mit denselben Aminosäuren, mit denen die Kohleversuche angestellt wurden, ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß die Aminosäuren mit der Gruppe CH_2NH_2 und $CHNH_2$ von 100 Mikromolen zugesetzten Wasserstoffsuperoxyds 24 bis 42 Mikromole verbraucht haben. Die Größenordnung der Reaktionsgeschwindigkeit für diese Aminosäuren ist also geradeso wie an Kohle, dieselbe.

Dagegen fällt wiederum, wie bei den Kohleversuchen, die tertiäre Aminosäure aus der Reihe heraus, die von 100 Mikromolen Wasserstoffsuperoxyd nur 6 Mikromole verbraucht hat.

Das Ergebnis ist, daß die Wirkung von Blutkohle auf Aminosäuren und die Wirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Aminosäuren in bemerkenswerter Weise übereinstimmt, eine Tatsache, die zugunsten der Auffassung spricht, daß die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle eine Oxydation durch aktivierten Sauerstoff ist.

Tabelle 4

175 Mikromole Aminosaure + 100 Mikromole Wasserstoffsuperoxyd gelost in 10 ccm Carbonatgemisch. 38°.

Aminosaure	Formel	v cmm O_2	$a-v$ cmm O_2	$(a-v)$ 0,089 Mikromole H_2O_2
Amino-Essigsaure .	$CH_2NH_2.COOH$	802	318	28
Amino-Propionsäure (d, l) . . .	$CH_3.CHNH_2.COOH$	782	338	30
n-Amino-Buttersäure (d, l)	CH_3 CH_2 $CHNH_2$ $COOH$	848	272	24
Iso-Amino-Buttersäure .	$(CH_3)_2.CNH_2.COOH$	1054	66	5,9
Iso-Amino-Valeriansäure (d, l) .	$(CH_3)_2.CH.CHNH_2.COOH$	727	393	35
Iso-Amino-Capronsäure (d, l) .	$(CH_3)_2.CH.CH_2.CHNH_2.COOH$	652	468	42
Iso-Amino-Capronsäure (l) .	dasselbe	715	405	36
n-Amino-Capronsäure (d, l) .	CH_3 $CH_2.CH_2.CH_2.CHNH_2.COOH$	762	358	32
ohne Aminosaure.	—	1120 (= a)	0	—

V. Protokolle zu Abschnitt II und III.

1. Aminoessigsaure ($CH_2NH_2.COOH$).

400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2 20°

t	$x = 1,2 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 3,4$ 10^{-2} Millimole	$x = 7,5$ 10^{-2} Millimole	$x = 1,5$ 10^{-1} Millimole
	$c = 1$ 10^{-2} Mole pro Liter	$c = 3,06 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 9,5 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 3,69$ 10^{-1} Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	8	11	20	31
40	14	20	33	57
60	18	30	46	75
80	22	36	56	94
100	25	43	65	112
120	28	47	73	128
140	31	54	83	—
160	34	61	90	—
180	37	67	100	—
$\frac{dv}{dt} / x$	12,5 (± 2,8)	9,1 (± 1,0)	6,0 (± 0,4)	5,9 (± 0,2)

2. *Amino-Propionsäure (d, l)* $(CH_3.CHNH_2.COOH)$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2. 20°.

t	$x = 1\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 2{,}8\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 7\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 1{,}3\cdot10^{-1}$ Millimole
	$c = 9\cdot10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}85\cdot10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 8{,}7\cdot10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}69\cdot10^{-1}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	8	8	12	17
40	9	11	20	29
60	14	17	28	40
80	19	22	36	52
100	21	26	43	62
120	24	31	51	74
140	27	36	58	85
160	29	38	63	93
180	31	43	71	105
200	34	46	76	114
$\frac{dv/dt}{x}$	13 (± 3,0)	7,2 (± 1,2)	4,7 (± 0,5)	4,0 (± 0,3)

3. *n-Amino-Buttersäure (d, l)* $(CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH)$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2. 20°.

t	$x = 2{,}3\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 6\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 1{,}45\cdot10^{-1}$ Millimole	$x = 2{,}6\cdot10^{-1}$ Millimole
	$c = 7{,}7\cdot10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}4\cdot10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 7{,}45\cdot10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}41\cdot10^{-1}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	8	13	17	20
40	12	21	29	36
60	19	32	44	55
80	24	40	58	70
100	29	49	72	88
120	33	56	84	104
140	38	66	98	121
160	44	75	114	141
180	48	83	127	157
200	53	93	142	178
$\frac{dv/dt}{x}$	10,9 (± 1,5)	7,4 (± 0,6)	4,9 (± 0,2)	3,7 (± 0,1)

4. *Iso-Amino-Buttersaure* $[(CH_3)_2.CNH_2.COOH]$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2. 20°.

t	$x = 2{,}5\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 6{,}4\ 10^{-2}$ Millimole	$x = 1{,}54\ 10^{-1}$ Millimole	$x = 3{,}94\cdot10^{-1}$ Millimole
	$c = 6{,}8\cdot10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}14\ 10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 6{,}8\cdot10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 2{,}11\cdot10^{-1}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	5	7	9	13
40	7	11	13	18
60	10	14	17	22
80	11	15	19	24
100	13	18	21	28
120	12	17	23	28
140	14	19	23	28
160	14	20	25	32
180	13	19	24	31
200	14	19	25	32
300	15	21	27	35
$\frac{dv}{dt} \over x$	0,6 (± 1,3)	0,3 (± 0,5)	0,2 (± 0,2)	0,1 (± 0,1)

5. *Iso-Amino-Valeriansaure (d, l)* $[(CH_3)_2.CH.CHNH_2\ COOH]$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2 20°.

t	$x = 2{,}3\ 10^{-2}$ Millimole	$x = 6{,}55\cdot10^{-2}$ Millimole	$x = 1{,}56\ 10^{-1}$ Millimole	$x = 3{,}2\cdot10^{-1}$ Millimole
	$c = 3\cdot10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 9{,}25\cdot10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 3{,}19\ 10^{-2}$ Mole pro Liter	$c = 1{,}105\ 10^{-1}$ Mole pro Liter
Min	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	6	11	13	17
40	10	17	24	28
60	13	25	37	44
80	20	35	50	57
100	24	42	63	71
120	27	49	74	85
140	31	57	85	97
160	37	65	97	111
180	39	72	107	123
$\frac{dv}{dt} \over x$	9,0 (± 1,5)	5,8 (± 0,5)	3,8 (± 0,2)	2,1 (± 0,1)

6. Iso-Amino-Capronsäure (d, l) $[(CH_3)_2 . CH . CH_2 . CHNH_2 . COOH]$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2. 20°.

t	$x = 2,17 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 5,4 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 1,28 \cdot 10^{-1}$ Millimole	$x = 2,5 \cdot 10^{-1}$ Millimole
	$c = 9 \cdot 10^{-4}$ Mole pro Liter	$c = 2,25 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 6,3 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 2,27 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	c cmm
20	8	16	23	20
40	14	29	42	39
60	20	42	60	59
80	26	57	83	85
100	31	71	106	114
120	37	90	133	147
140	44	106	162	184
160	51	125	192	225
180	58	143	223	268
200	65	161	257	314
220	73	181	293	364
240	77	199	326	413
$\frac{dv}{dt} / x$	16,1 (± 1,5)	16,9 (± 0,6)	13,4 (± 0,3)	9,9 (± 0,1)

7. Iso-Amino-Capronsäure (l) $[(CH_3)_2 . CH . CH_2 . CHNH_2 . COOH]$.
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2 20°

t	$x = 2,4 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 6 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 1,31 \cdot 10^{-1}$ Millimole	$x = 2,57 \cdot 10^{-1}$ Millimole
	$c = 7,4 \cdot 10^{-4}$ Mole pro Liter	$c = 1,85 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 6,5 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 2,33 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	9	17	22	22
40	14	29	41	42
60	21	41	62	65
80	27	55	88	97
100	33	70	115	128
120	39	85	143	166
140	47	103	178	210
160	53	121	214	260
180	60	139	250	310
$\frac{dv}{dt} / x$	14,6 (± 1,4)	15,0 (± 0,6)	13,7 (± 0,3)	9,7 (± 0,1)

8. n-Amino-Capronsäure ($CH_3.CH_2$ $CH_2.CH_2.CHNH_2.COOH$)
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2. 20°.

t	$x = 2{,}7 \cdot 10^{-2}$ Millimole	$x = 6{,}8\ 10^{-2}$ Millimole	$x = 1{,}5 \cdot 10^{-1}$ Millimole	$x = 2{,}88 \cdot 10^{-1}$ Millimole
	$c = 3{,}4\ 10^{-4}$ Mole pro Liter	$c = 8\ 10^{-4}$ Mole pro Liter	$c = 4 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter	$c = 1{,}92 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter
Min.	v cmm	v cmm	v cmm	v cmm
20	6	9	11	11
40	15	25	30	31
60	25	37	48	49
80	33	47	63	66
100	41	61	81	87
120	49	74	99	108
140	58	88	119	130
160	67	101	138	154
180	77	115	158	177
200	85	124	177	201
$\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$	16,7 (± 1,2)	10,0 (± 0,5)	6,5 (± 0,2)	4,1 (± 0,1)

9 Iso-Amino-Capronsäure (tertiär) [$(CH_3)_2.CNH_2.CH_2$ $CH_2.COOH$]
400 mg Kohle, 10 ccm H_2O, Gasraum O_2 20°.

t	$x = 2\ 10^{-1}$ Millimole
	$c = 1\ 10^{-2}$ Mole pro Liter
Min	v cmm
30	3
60	5
90	8
120	10
180	13
240	15
300	19
$\frac{\frac{dv}{dt}}{x}$	0,32 (± 0,2)

Pflugers Archiv f. d. ges. Physiol. **200**, 203 1923.

Über die sogenannte Autoxydation des Cysteins.

Von

Otto Warburg und Seishi Sakuma.

(Eingegangen am 4. Juli 1923.)

Fügt man zu einer neutralen Losung von Cystein Eisensalz, so erscheint eine violette Farbung, die beim Stehen der Losung verschwindet, beim Schütteln wiederkehrt, bis das gesamte Cystein zu Cystin oxydiert ist Bei Zusatz von Blausäure tritt an Stelle der violetten eine tiefblaue Farbung

Mißt man gleichzeitig die Geschwindigkeiten der Sauerstoffaufnahme, so findet man sie durch Eisenzusatz gesteigert, durch Blausaurezusatz gehemmt Und zwar hemmt Blausaure nicht nur die Oxydation der Losung, der Eisen zugesetzt ist, sondern auch die Oxydation der Losung, der kein Eisen zugesetzt ist

Die Wirkung der Blausaure im ersten Fall ist klar An Stelle der katalytisch wirksamen violetten Cystein-Eisenverbindung tritt eine andere komplexe Eisenverbindung (wahrscheinlich eine Verbindung zwischen Eisen, Blausaure und Cystein), die katalytisch unwirksam ist Die Wirkung der Blausaure im zweiten Fall ist zunachst unklar Keinesfalls beruht sie auf einer Reaktion zwischen Cystein und Blausaure, da ein Molekul Blausaure die Oxydation von 1000 Molekulen Cystein vollstandig hemmt, eine Bindung von Blausaure an Cystein jedoch die Oxydationsgeschwindigkeit nur um $^1/_{1000}$ hemmen konnte Die Schwierigkeit verschwindet, wenn wir annehmen daß Cystein selbst nicht merklich autoxydabel ist, daß auch in den Fallen in denen Eisen nicht zugesetzt wurde, die Cysteinlosungen immer kleine Mengen Metall als Verunreinigung enthielten

Diese Annahme, die der eine von uns vor einiger Zeit ausgesprochen hat[1], wird von E Abderhalden[2] und Wertheimer in 4 Arbeiten angegriffen Abderhalden und Wertheimer wiederholen einige der Versuche von Mathews und Walker[3] sie wiederholen die Ansicht von

---

[1] Warburg, O · Physikalische Chemie der Zellatmung. Biochem Zeitschr **119**, 152. 1921.

[2] Abderhalden, E u. E Wertheimer. Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. **197** bis **199**. 1922—1923.

[3] Mathews u. Walker: Journ. of biol chem. **6**, 21 u. 29. 1906.

Mathews und Walker, daß die Oxydation metallfreien Cysteins durch Blausäure gehemmt werde, und stellen daran anschließend eine Reihe sich widersprechender, physikalisch unhaltbarer Theorien auf. Wir wollen diesen Angriffen durch Mitteilung von Versuchen[1] begegnen, aus denen hervorgeht, daß die genannte und so überaus einleuchtende Annahme in allen Punkten richtig ist.

I. *Die Wirkung von Pyrophosphat auf die Cysteinoxydation.*

Beruht die Wirkung der Blausäure auf der Bildung einer komplexen Schwermetallverbindung, so ist zu erwarten, daß die Cysteinoxydation nicht nur durch Blausäure, sondern auch durch andere komplexbildende Stoffe gehemmt werden kann, und zwar durch solche, deren Metallverbindungen „komplexer" sind als die Cystein-Metallverbindungen. Ein solcher Stoff ist, wie wir gefunden haben, Natriumpyrophosphat. Eine $^1/_{100}$ molare Lösung von Natriumpyrophosphat hemmt — bei einer Wasserstoffionenkonzentration von 10^{-9} — die Cysteinoxydation ebenso stark wie Cyankalium, während die nichtkomplexbildenden Phosphate unter sonst gleichen Bedingungen ohne jeden Einfluß auf die Cysteinoxydation sind.

Der Ausfall dieses Versuchs sprach so außerordentlich zugunsten unserer Annahme, daß wir an die — wie zu erwarten war, nicht leichte — Aufgabe herangingen, dem komplexbildenden Cystein Spuren von Schwermetall zu entziehen.

II. *Reinigung des Cysteins.*

Es waren zwei Methoden der Reinigung, die, vereint angewandt, zum Ziel führten. Die erste beruht auf der Beobachtung, daß alkalische Cysteinlösungen, die mit Bariumchlorid gesättigt sind, beim Stehen mit Bariumhydrosulfit allmählich Metallsulfid abscheiden. Die zweite beruht auf der Beobachtung, daß man Cysteinchlorhydrat, wenn auch mit großen Verlusten, aus Äthylalkohol umkrystallisieren kann und daß dabei das verunreinigende Metall fast vollständig in den Mutterlaugen bleibt.

Da Glasgefäße merkliche Mengen Eisen abgeben, so wurde in Gefäßen von Quarz oder von glasiertem Porzellan gearbeitet. Alle Flüssigkeiten wurden aus Quarz in Quarz destilliert. Die Gefäße zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit bestanden aus Quarz. Das zur Neutralisation des Cysteins erforderliche Alkalihydroxyd wurde aus destilliertem Natriummetall hergestellt oder es wurde Ammoniak aus Quarz in Quarz destilliert. Die Bürette, aus der das Alkali zugetropft wurde, bestand aus Quarz.

---

[1] Die Versuche werden in einer chemischen Zeitschr. ausführlich beschrieben.

Unser Ausgangsmaterial war aus Haaren hergestelltes Cystin von der spezifischen Drehung $\alpha_{[D]}$ — 216° (gelost in n-Salzsäure). Das Rohcystein gewannen wir nach der Methode von BAUMANN durch Reduktion mit Zinn und Salzsäure.

Das auf die geschilderte Weise gereinigte Cysteinchlorhydrat schmolz bei schnellem Erhitzen im geschlossenen Capillarrohr zwischen 192 und 196° unter Zersetzung Bei der Oxydation mit Jod lieferte es ein Cystin von der spezifischen Drehung $\alpha_{[D]} = -228°$, während E FISCHER und SUSUKIe in $\alpha_{[D]}$ von —222° angeben. Die hierbei verbrauchte Menge Jod war etwas mehr, als sich nach der Formel $(C_3H_7O_2NS)HCl$ berechnet, weil dem Chlorhydrat freies Cystein beigemengt ist

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit losten wir 20—50 mg Cysteinchlorhydrat in wenig Wasser, fugten Alkali hinzu, bis die Wasserstoffionenkonzentration $10^{-7,7}$ war, füllten auf 10 ccm auf und bestimmten die Oxydationsgeschwindigkeit nach der Druckmethode in oft beschriebener Weise Die Temperatur war 20°, im Gasraum befand sich Luft.

Wir wollen unsere Resultate ausdrücken durch den Quotienten $Q_{Cystein}$

$$\frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Cysteinchlorhydrat} \times \text{Minuten}}$$

und denselben Quotienten aus den bisher vorliegenden Messungen berechnen aus der Arbeit von MATHEWS und WALKER[1] und aus der Arbeit von DIXON[2], die in dem Laboratorium von HOPKINS ausgefuhrt worden ist Wir finden so

	$Q_{Cystein}$
MATHEWS und WALKER	0,08
DIXON	0,2
WARBURG und SAKUMA	0,0008

Die Oxydationsgeschwindigkeit unseres gereinigten Cysteins ist also nur $^1/_{100}$—$^1/_{250}$ der bisher gemessenen Geschwindigkeit Die Zeit halben Umsatzes — nach MATHEWS und WALKER und nach DIXON einige Stunden — betragt in unserem Fall 14 Tage Mindestens 99,7% der bisher als Autoxydationsgeschwindigkeit des Cysteins gemessenen Große war mithin auf Verunreinigung beruhende Katalyse

ABDERHALDEN und WERTHEIMER haben Messungen der Oxydationsgeschwindigkeit mit ihren Losungen nicht ausgefuhrt Aber aus der Angabe, daß die Oxydation nach 15stundigem Stehen ihrer Losungen fast beendet war, folgt, daß sie ganz außerordentlich unreine Praparate in Handen gehabt haben.

---

[1] MATHEWS und WALKER, loc. cit.

[2] DIXON, M.: Proc. of the roy. soc. of London, B., 94, 266. 1923. Herr DIXON teilte uns brieflich mit, daß seine Messungen bei 20° ausgefuhrt sind.

III. Oxydationsgeschwindigkeit der Cystein-Eisenverbindung

Losen wir 20 mg unseres reinsten Cysteinchlorhydrats in 10 ccm Wasser, so erhalten wir (bei 20° und der Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-7,7}$) einen Sauerstoffverbrauch von 1 cmm pro Stunde. Fugen wir zu dieser Mischung $^1/_{10000}$ mg Eisen in Form von Eisenchlorid, so steigt der Sauerstoffverbrauch auf 9 cmm pro Stunde Wir konnen also Eisenmengen von einigen hunderttausendstel Milligrammen, die sich in 10 ccm befinden, durch die Cysteinkatalyse bequem nachweisen, was weder durch die Rhodanreaktion noch durch die Farbung der Cystein-Eisenverbindung moglich ist Es hat also keinen Sinn, wenn ABDERHALDEN und WERTHEIMER bei negativem Ausfall der Rhodanreaktion erklaren, ihre Losungen seien „einwandfrei eisenfrei" gewesen.

Aus den angefuhrten Zahlen folgt, daß 1 mg Eisen, einer Cysteinlosung von der Wasserstoffionenkonzentration $10^{-7,7}$ hinzugefugt, bei 20° pro Minute 1700 cmm Sauerstoff ubertragen kann. Wie es scheint, ist diese Zahl innerhalb gewisser „Verunreinigungsgrenzen" unabhangig von der Eisenkonzentration, so daß wir sie benutzen konnen, um uns in jedem Fall die als Verunreigigung vorhandene Eisenmenge aus der Oxydationsgeschwindigkeit zu berechnen Tun wir das fur unsere unreinen Praparate, so finden wir eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen den berechneten und den in der Asche tatsachlich gefundenen Eisenmengen, was besagt, daß die wirksame Verunreinigung unserer Praparate immer und ausschließlich Eisen war

Andere Forscher mogen in ihren Losungen neben Eisen noch andere Verunreinigungen gehabt haben, etwa Kupfer (aus dem destillierten Wasser) oder Mangan (aus den Glasern)

IV Ergebnis.

Die bisher als Autoxydation des Cysteins beschriebene Erscheinung ist eine Metallkatalyse gewesen, beruhend auf Oxydation und Reduktion einer komplexen Cystein-Metallverbindung.

Durch dieses Ergebnis wird die Theorie der Atmung noch fester begrundet, als sie es bisher schon war Denn der einzige Fall, in dem Blausaure die Oxydation eines schwermetallfreien Systems antikatalytisch zu hemmen schien, ist nunmehr als Schwermetallkatalyse erkannt

Biochem. Zeitschr. 142, 68. 1923.

Über die sogenannte Autoxydation des Cysteins.

Von

Seishi Sakuma.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7 August 1923.)

Mit 4 Abbildungen

Das Cystein[1] gehort zu denjenigen Stoffen, die man als „autoxydabel" bezeichnet, ein Ausdruck, mit dem man sagen will, daß Cysteinmolekule und Sauerstoffmolekule, wenn sie unter gewissen Bedingungen zusammentreffen, „von selbst" ohne Beteiligung anderer Stoffe, miteinander reagieren.

Nach den im folgenden beschriebenen Versuchen, die ich auf Anregung und unter Leitung von Herrn WARBURG ausgefuhrt habe[2], scheint diese Auffassung nicht zuzutreffen. Die Reaktionsfähigkeit von Cysteinpraparaten nimmt mit fortschreitender Reinigung mehr und mehr ab. Was man bisher als Autoxydation des Cysteins beschrieben hat, ist nichts anderes gewesen als eine Oxydationskatalyse durch Verunreinigungen.

I. Der Ausgangspunkt der Arbeit.

Fugt man zu einer neutralen Cysteinlosung Eisenchlorid, so erscheint eine Violettfarbung, die beim Stehen der Losung verschwindet, beim Schutteln wiederkehrt, bis das gesamte Cystein zu Cystin oxydiert ist. Bei Zusatz von Blausaure verschwindet die violette Farbung, an ihre Stelle tritt nach wenigen Sekunden eine tiefblaue unbestandige Färbung. — Diese Erscheinungen zeigen erstens, daß Eisen mit Cystein

[1] Vgl. O. MEYERHOF: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 200, 1. 1923.
[2] Vgl. O. WARBURG u. SAKUMA: Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. 200, 203. 1923.

eine Komplexverbindung eingeht, zweitens, daß Blausaure mit der Cystein-Eisenverbindung unter Bildung eines cyanhaltigen Komplexes reagiert.

Mißt man die Geschwindigkeit, mit der sich eine Cysteinlosung unter dem Einfluß der genannten Zusatze oxydiert, so findet man, daß Eisen die Oxydation beschleunigt, Blausaure die Wirkung des Eisens aufhebt, wie zuerst Mathews und Walker[1], spater viele andere festgestellt haben. Die Deutung ist nach dem Vorhergehenden einfach. Die katalytische Wirkung des Eisens beruht auf der Reaktionsfahigkeit der komplexen Cystein-Eisenverbindung, die antikatalytische Wirkung der Blausaure auf der Bildung einer katalytisch unwirksamen Eisen-Cyanverbindung.

Liegen die Verhaltnisse so weit klar, so fugen Mathews und Walker eine Beobachtung hinzu, deren Deutung auf große Schwierigkeiten stoßt Nach Mathews und Walker namlich hemmt Blausäure nicht nur die Oxydation der eisenhaltigen Cysteinlosungen, sondern auch die Oxydation reiner, metallfreier Cysteinlosungen, und zwar genugt 1 Molekul Blausaure zur Inaktivierung von 1000 Cysteinmolekülen

Reagiert Blausaure, wie Mathews und Walker annehmen, mit dem Cystein selbst[2], so ist zunachst nicht einzusehen, wie 1000 Molekule Cystein durch ein Molekul Blausaure inaktiviert werden konnen, es sei denn, die Blausaure wandere von Cysteinmolekul zu Cysteinmolekul und werde immer nur von denjenigen Molekulen gebunden, die im Begriff sind, mit Sauerstoff zu reagieren Da etwas derartiges zwar moglich, bisher aber nicht beobachtet ist, so wird man zunachst nach einer anderen Erklarung suchen

Eine solche ist in der Annahme enthalten[3], das „reine“ Cystein, das man bisher in Handen gehabt hat, sei kein reines, sondern durch Metall verunreinigtes Cystein gewesen Das Einleuchtende dieser Erklärung liegt darin, daß sie die Wirkung der Blausaure auf die Cysteinoxydation einheitlich deutet, wahrend Mathews und Walker zwei verschiedene Mechanismen zugrunde legen, je nachdem das Cystein metallhaltig oder metallfrei ist.

---

[1] Mathews u Walker· Journ of biol Chem. 6, 20, 29, 299 1909.

[2] Mauthner, J., hat gefunden (Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol Chem 78, 32. 1912), daß Cystin, wie durch Zinn und Salzsaure, so auch durch schweflige Säure oder durch Cyankali zu Cystein reduziert wird, Versuche, die Abderhalden und Wertheimer wiederholt und — ohne Mauthner zu zitieren — vor kurzem mitgeteilt haben. Mauthner fand auch, daß sich bei langer Einwirkung von Cyankali auf Cystein Rhodanominopropionsaure bildet, eine an sich sehr interessante Tatsache, die aber mit der oxydationshemmenden Wirkung der Blausaure, schon weil es sich hier um einen stochiometrischen Umsatz handelt, nichts zu tun hat

[3] Warburg, O : diese Zeitschr 119, 152 1921.

II. Die Methode der Oxydationsmessung

war die in dem Dahlemer Institut ubliche. Die Form des Meßgefaßes, das aus Quarz geblasen war, zeigt Abb 1. Ist v_F das Volumen der eingefullten Flüssigkeit in Kubikzentimetern, v_G das Volumen des Gasraumes in Kubikzentimetern, T die (absolute) Versuchstemperatur, α der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs, h die beobachtete Druckänderung in Millimetern Brodieschér Flüssigkeit, x der gesuchte Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimetern, so ist

$$x = h\left[\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F\alpha}{10}\right].$$

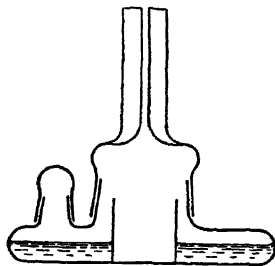



Abb 1

v_F war im allgemeinen 10 ccm, v_G 10 bis 20 ccm, T 293 — 310°, der eingeklammerte Ausdruck — die „Gefaßkonstante" — demnach 1—2 was bedeutet, daß eine Druckabnahme von 1 mm einen Sauerstoffverbrauch von 1—2 cmm anzeigte

Die Versuchszeiten betrugen 30—120 Minuten Waren die Präparate einigermaßen rein so war die Oxydationsgeschwindigkeit innerhalb der Versuchszeiten konstant, da sich nur ein unbetrachtlicher Teil der gelosten Cysteinmenge oxydierte Dann konnte die Geschwindigkeit der Oxydation pro Gewichtseinheit Cysteinchlorhydrat in einfacher Weise berechnet werden Waren m mg Cysteinchlorhydrat eingewogen und nach t Minuten v cmm Sauerstoff verbraucht so war die gesuchte Große

$$\frac{v}{m \times t}\left[\frac{\text{cmm}}{\text{Milligramm} \times \text{Minuten}}\right]$$

Auf eine Behandlung der Cysteinoxydation nach den Regeln der chemischen Kinetik habe ich aus naheliegenden Grunden verzichtet

III. Die Wasserstoffionenkonzentration

der Cysteinlosungen spielt in der Literatur eine gewisse Rolle, und zwar wird angegeben, bei einem p_H von 7 5—8 0 liege das Maximum der Oxydationsgeschwindigkeit Fur Rohpraparate mag dies in vielen Fallen zutreffen

Ich habe bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen gearbeitet, im allgemeinen, um meine Zahlen mit denen der Literatur vergleichen zu konnen, bei einem p_H von 7,7.

Da es nicht angeht, die zur Oxydationsmessung dienende Lösung mit Indikatoren zu verunreinigen, so wurde durch einen Vorversuch der pro Milligramm Cysteinchlorhydrat erforderliche Alkalizusatz er-

mittelt und daraus die Alkalimenge, die der Versuchslosung zugesetzt werden mußte, berechnet Nach Beendigung der Oxydationsmessung wurde dann zur Kontrolle die Wasserstoffionenkonzentration der Versuchslösungen mit Hilfe von Indikatoren bestimmt

IV. Die Darstellung des Rohcysteins

geschah nach der Methode von BAUMANN[1] unter Befolgung der Vorschrift von E. FRIEDMANN[2]. Das zur Reduktion verwendete Cystin war aus Haaren hergestellt und besaß die spezifische Drehung $\alpha_{[D]}$ — 216° Es wurde mit der zehnfachen Menge Salzsaure (1 Teil konzentrierte Saure, 2 Teile Wasser) ubergossen und nach Zusatz von Zinn und einem Kornchen Platinchlorid 6 Stunden auf dem Wasserbade erwarmt Dann wurde mit dem fünffachen Volumen Wasser verdunnt, das Zinn mit Schwefelwasserstoff ausgefallt und das Filtrat im Vakunm zur Trockne verdampft

Die Oxydationsgeschwindigkeit des so gewonnenen Cysteins (vergleiche Tabelle 3) war von der Großenordnung, die bisher in der Literatur für das reine Cystein angegeben worden ist

V. Die Wirkung von Pyrophosphat auf die Cysteinoxidation.

Auf Grund der in Abschnitt I geaußerten Annahme war zu erwarten, daß nicht nur Blausäure, sondern auch andere Komplexbildner die Cysteinoxydation hemmen, namlich solche, die festere Komplexe bilden als das Cystein, also imstande sind, der Cystein-Metallverbindung das Metall zu entreißen

Von Komplexbildnern habe ich gepruft Oxalate, Tartrate, Rhodanide und Pyrophosphate Die drei erstgenannten zeigten keinen hemmenden Einfluß, dagegen hemmte Natriumpyrophosphat[3] — in m/100 oder m/10 Losung — die Cysteinoxydation in ahnlichem Maße wie Blausaure Kontrollen mit gewohnlichen, nicht komplexbildenden Phosphaten verliefen negativ

Zu den Versuchen benutzte ich das nach dem vorigen Abschnitt dargestellte Rohcystein, das ich bei Wasserstoffionenkonzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-10} mit dem Pyrophosphat in Reaktion brachte Ist die Reaktion saurer, so ist die Komplexbildung unvollstandiger, die hemmende Wirkung geringer

Zwei Versuche mit Pyrophosphat, bei zwei verschiedenen Wasserstoffkonzentrationen, sind in den Tabellen 1 und 2 zahlenmaßig, in

---

[1] BAUMANN, E Hoppe-Seylers Zeitschr. f physiol. Chem. 8, 299. 1883/84.
[2] FRIEDMANN, E : Hofmeisters Beiträge 4, 504. 1904
[3] Über Eisen-Pyrophosphatkomplexe vgl die schone Arbeit von M. P. PASCAL, Ann de Chim. et Phys. (8) 16, 359 und 520. 1909.

Tabelle 1. *37,5°. Gasraum Luft.* $p_H = 9,24$. *Rohcystein.*

Zeit in Minuten	Sauerstoffverbrauch in cmm		
	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm Wasser	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm m/10 Natrium-pyrophosphat	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm m/1000 Kaliumcyanid
10	94,2	2,6	4,6
20	164	6,05	8,4
30	224	9,5	13,0
40	274	13,0	16,8
50	312	16,4	20,6
60	340	18,2	22,2

Tabelle 2. *37,6°. Gasraum Luft.* $p_H = 10,2$. *Rohcystein.*

Zeit in Minuten	Sauerstoffverbrauch in cmm		
	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm Wasser	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm m/10 Natrium-phosphat	16 mg Cystein-HCl in 10 ccm m/1000 Kaliumcyanid
10	96	6,84	7,7
20	155,5	10,25	10,6
30	208	13,7	13,7
40	252	16,2	16,7
50	292	19,65	19,75
60	325	23,1	23,5

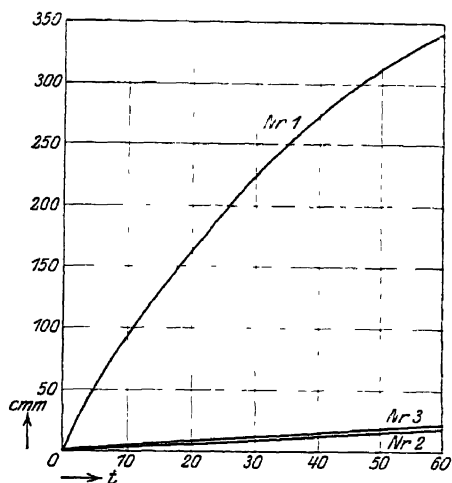



Abb. 2. Kurve 1: Cystein in Wasser. Kurve 2: in Pyrophosphat. Kurve 3: in Cyanid. — p_H 9,24.

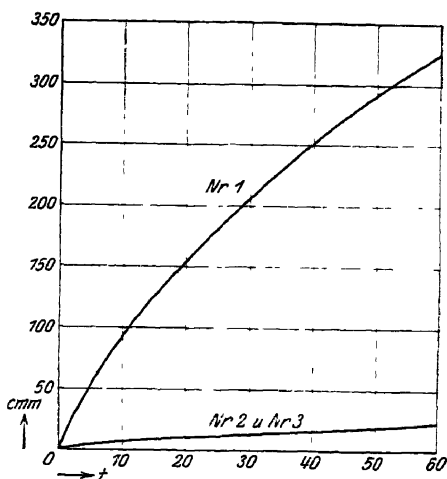



Abb. 3. Kurve 1: Cystein in Wasser. Kurve 2 u. 3: Cystein in Pyrophosphat und Cyanid. — p_H 10,2.

den Abb. 2 und 3 graphisch wiedergegeben, zum Vergleich sind zwei Parallelversuche mit Blausäure eingetragen. Man erkennt aus diesen Beispielen die ähnliche Wirkung der beiden Komplexbildner.

Fast kann man sagen, daß das Ergebnis der Pyrophosphatversuche die Frage, um die es sich in dieser Arbeit handelt, entschied Jedenfalls ermutigte es zu dem — wie vorauszusehen war, nicht leichten — Unternehmen, dem komplexbildenden Cystein Spuren von Schwermetall zu entziehen

VI. Die Reinigung der Reagenzien

geschah mittels der in Abb 4 wiedergegebenen Vorrichtung *K* ist ein Quarzkolben, *H* eine Quarzhaube, *P* ein glasierter Porzellanbecher, *St* der Stopfen fur den Porzellanbecher, *D* eine Platinspirale

Zur Prüfung des Gerates destilliert man zunachst Wasser in den Porzellanbecher uber, fullt dann den Quarzkolben mit konzentrierter Salzsaure und erwarmt, wobei das Ansatzrohr des Quarzkolbens nicht in das Wasser eintaucht, sondern frei uber dem Wasserspiegel mundet Ist die Salzsaure in dem Porzellanbecher sechsfach normal geworden, so unterbricht man die Destillation und verdampft 20 ccm der Salzsaure, unter Zusatz eines Kornchens reinen Kaliumchlorats, in einem Porzellantiegel auf dem Wasserbade Der Ruckstand wird mit 1 ccm Wasser aufgenommen, in ein Reagensglas ubergefuhrt und mit 1 ccm 10proz Rhodankaliumlosung und 1 ccm der destillierten sechsfach normalen Salzsaure versetzt Stellt man das Reagensglas auf eine hell beleuchtete weiße Unterlage und sieht von oben hinein, so darf keine Farbung, auch kein Stich ins Gelbliche, zu sehen sein Wird dieser Forderung Genuge getan, so sind in 20 ccm der destillierten Salzsaure weniger als $^{1}/_{10000}$ mg Eisen, und das Material der Destillationsvorrichtung, der Quarz und die Porzellanglasur, ist brauchbar. Die Prüfung des Gerätes geschieht mit Salzsaure, weil diese Saure besonders leicht Metall aus dem Gerät herauslost

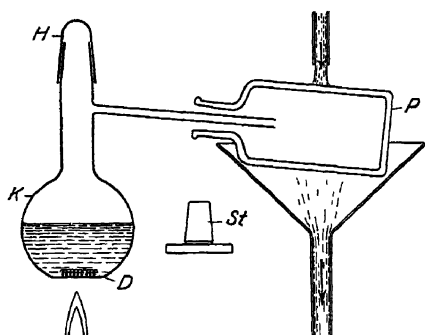



Abb 4

Wie die Salzsaure, so werden auch Wasser, Äthylalkohol und Propylalkohol destilliert und in glasierten Porzellanbechern aufbewahrt

Was das Alkali anbetrifft, das man zur Neutralisation des Cysteins braucht, so gibt es im Handel Natriummetall, das, in einer Porzellanschale in Wasser aufgelost, eine genugend reine Lauge liefert Macht man die Laugen n/10 und prüft 20 ccm, wie oben die Salzsäure, so findet man oft keine Spur einer Farbung bei Zugabe des Rhodanids — Bequemer und sicherer ist es, sich das metallfreie Alkali durch Destillation

von käuflichem Ammoniakwasser, dem man etwas Bariumchlorid zusetzt, zu verschaffen.

Konsequenterweise wird man das Alkali nicht aus einer Glas-, sondern aus einer Quarzburette zufließen lassen und wird die Cysteinlösung nicht in Glas, sondern in Quarz bereiten.

Ich habe die Erfahrung gemacht, daß Verunreinigungen durch Luftstaub, wenn man einigermaßen vorsichtig arbeitet, nicht zu fürchten sind. Dagegen hat man sich vor Verunreinigungen zu hüten, die durch Berührung besonders der Stopfen mit den Fingern entstehen können. Am besten trocknet man alle Gefäße in einer Umwicklung mit „quantitativen“ Filtern und arbeitet dann weiter etwa so, wie bei bakteriologischen Versuchen. Bei Befolgung dieser Vorschriften wird man Unregelmäßigkeiten kaum erleben.

VII. Die Reinigung des Cysteins.

Da die Oxydation des Rohcysteins in alkalischer Lösung langsamer verläuft als in neutraler Lösung, so ist anzunehmen, daß die komplexen Cystein-Metallverbindungen in alkalischer Lösung weniger beständig sind als in neutraler Lösung. Unter diesem Gesichtspunkte behandelte ich Rohcystein in alkalischer Lösung mit Alkalisulfid.

Eine Lösung von 20 g Cysteinchlorhydrat in 100 ccm Wasser wurde mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Dann wurden 2 Moleküle feingepulverten Barythydrats eingetragen, eine halbe Stunde Schwefelwasserstoff durchgeleitet und einige Stunden in verschlossenem Gefäß stehen gelassen. Allmählich bildete sich ein schwarzer Niederschlag von Metallsulfid, von dem durch ein „quantitatives“ Filter abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde im Quarzkolben mit reiner Salzsäure übersättigt, der entstehende Schwefelwasserstoff durch Evakuieren entfernt und schließlich in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der feingepulverte Rückstand, ein Gemisch von Cysteinchlorhydrat und Bariumchlorid, blieb zwecks völliger Trocknung und Entfernung von überschüssiger Salszäure 24 Stunden im Vakuumexsikkator über festem Kaliumhydroxyd stehen und wurde dann in der Kälte mit Alkohol mehrfach extrahiert. Das Extrakt war bariumfrei und hinterließ beim Verdunsten im Vakuum das gereinigte Cysteinchlorhydrat, das ich im folgenden als „Cysteinchlorhydrat I“ bezeichne.

Zur weiteren Reinigung kristallisierte ich das Präparat I aus der fünffachen Menge Äthylalkohols oder Propylalkohols um, wobei ich, um Veresterung zu vermeiden, nur kurze Zeit erwärmte. Aus dem alkoholischen Filtrat fiel die Substanz beim Abkühlen in langgestreckten, zu Büscheln vereinigten Täfelchen, mit einer Ausbeute von etwa 10%, aus. Ich bezeichne das so gewonnene Präparat als „Cysteinchlorhydrat II“.

Die gereinigten Cysteinchlorhydrate sind basische Chlorhydrate, deren Gehalt an Cystein durch Titration mit Jod in alkoholischer Lösung bestimmt wurde. Beispielsweise verbrauchten 0,1523 g eines lufttrockenen Präparates II, in 96proz Alkohol gelöst, 10,3 ccm n/10 Jodlösung, während sich für das neutrale Salz $(C_3H_7O_2NS)HCl$ 9,7 ccm Jodlösung berechnet

Das bei der Titration mit Jod ausfallende Cystin wurde durch Bestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff und der spezifischen Drehung identifiziert

0,1505 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,1652 g CO_2 und 0,0718 g H_2O, d. i. 29,94% C und 5,33% H Berechnet für Cystin. 30,0% C und 5,00% H. 0,014 g Substanz, mit n HCl zu 20 ccm gelöst, drehten die Polarisationsebene gelben Lichts im 2 dm-Rohr 0,32 Grade nach links, also $\alpha_{[D]} = -228^0$, während E. Fischer und Susuki für die spezifische Drehung des Cystins — 222° angeben

VIII. Die Oxydationsgeschwindigkeit des gereinigten Cysteins wurde nach dem in Abschnitt II beschriebenen Verfahren gemessen. In Tabelle 3 sind einige Versuche zusammengestellt, aus denen hervor-

Tabelle 3.
1 mg Cysteinchlorhydrat verbraucht beim Übergang in Cystin 35,7 cmm Sauerstoff.

Präparat	Menge des Cystein-HCl mg	Volumen, in dem das Cystein gelöst war ccm	p_H der Lösung	Temperatur bei dem Versuch °C	Sauerstoffverbrauch cmm	$\frac{cmm}{mg \times Min}$
Mathews u Walker[1].	2000	50	neutral	Zimmertemperatur	etwa 7000 pro Stunde	0,07
Dixon u. Tunnicliffe[2].	9,1	?	7,6	20	95 in 50 Min	0,21
Eigenes Präparat Rohcystein	16	10	9,24	37,5	370 pro Stunde	0,354
Eigenes Präparat Rohcystein	16	10	6,8	37,5	191 pro Stunde	0,199
Cystein I	16	10	6,8	37,5	13,94 pro Stunde	0,0145
„ I	16	10	7,6	37,5	15,6 pro Stunde	0,0162
„ II	24.8	8	7,7	20	3,66 pro Stunde	0,0024
„ II	42,3	10	7,7	20	3,35 pro Stunde	0,0013
„ II	16,3	10	7,7	20	1,54 in 2 Stunden	0,0008

[1] Mathews u Walker, l c

[2] Dixon u. Tunnicliffe: Proc Roy Soc London 94, 266 1923

geht, wie groß der Einfluß des Reinigens auf die Oxydationsgeschwindigkeit ist. Die Tabelle beginnt mit den besten bisher ausgeführten Versuchen, nämlich mit denen von MATHEWS und WALKER[1] und von DIXON und TUNNICLIFFE[2], die für den Quotienten $\frac{\text{Kubikmillimeter}}{\text{Milligramm} \times \text{Minuten}}$ den Wert 0,1—0,2 bei Zimmertemperatur fanden. Unser Rohcystein gab bei 37° Werte von 0,2—0,4, also dieselbe Größenordnung. Durch die Behandlung mit Bariumsulfid sinkt der Wert des Quotienten (Präparate I) auf etwa 0,01 und durch das darauffolgende Umkristallisieren (Präparate II) bis auf etwa 0,001. Unser bestes Präparat oxydiert sich 100mal langsamer als die Präparate von MATHEWS und WALKER und 250mal langsamer als das Präparat von DIXON und TUNNICLIFFE. — Sehr anschaulich kann man dies Ergebnis auch so ausdrücken: die Zeit, die zur Oxydation der halben in Lösung befindlichen Cysteinmenge erforderlich ist, beträgt nach MATHEWS und WALKER sowie DIXON und TUNNICLIFFE einige Stunden, für unser reinstes Präparat 14 Tage.

Was man also bisher als „Autoxydation“ des Cysteins bezeichnet hat, ist — zum mindesten zu 99% — nichts anderes gewesen als eine Oxydationskatalyse durch Verunreinigungen.

IX. Die Reaktionsfähigkeit der Cystein-Eisenverbindung

bestimmen wir, indem wir zu einer gereinigten Cysteinlösung Eisen in Form von Eisenchlorid setzen und die Oxydationsgeschwindigkeit *vor* und *nach* dem Eisenzusatz ermitteln. Der Quotient

$$\frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs vor dem Zusatz} - \text{cmm verbrauchten Sauerstoffs nach dem Zusatz}}{\text{mg zugesetzten Eisens} \times \text{Minuten}},$$

der mit n_{Fe} bezeichnet werde, gibt dann ein Mindestmaß für die Reaktionsfähigkeit der Komplexverbindung.

Einige Versuche, aus denen n_{Fe} berechnet werden kann, sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Aus ihnen erkennen wir die enorme Reaktionsfähigkeit der Komplexverbindung. In wenigen Sekunden reagiert die gesamte jeweils zugesetzte Eisenmenge.

Wir erkennen weiterhin, daß $^1/_{10000}$ mg Eisen noch eine sehr bequem meßbare Wirkung hervorruft. Einige $^1/_{100000}$ mg Eisen, einem Volumen von 10 ccm zugesetzt, können also mittels der Cysteinkatalyse nachgewiesen werden, was — soviel mir bekannt ist — mit keiner der gewöhnlichen analytischen Methoden möglich ist. Es hat deshalb keinen Sinn, eine Cysteinlösung, die mit Rhodan keine Rotfärbung gibt, als „einwandfrei eisenfrei“[3] zu bezeichnen.

---

[1] MATHEWS u. WALKER, l. c.

[2] DIXON u. TUNNICLIFFE: Proc. Roy. Soc. London 94, 266. 1923.

[3] Vgl. E. ABDERHALDEN: Arch. f. d. ges. Physiol. 198, 125. 1923.

Tabelle 4. 1 mg Fe^{II} verbraucht beim Übergang in Fe^{III} 100 cmm Sauerstoff.

Nr.	Cystein-chlor-hydrat mg	Flüssigkeits-volumen, in dem das Cystein gelöst war ccm	p_H	Temperatur bei der Oxydations-messung °C	Sauerstoff-verbrauch cmm	n_{Fe}
1	66,8	10	7,7	20	ohne Fe-Zusatz *21,7* in 60 Minuten + 0,0005 mg Fe *83,0* in 60 Minuten	2000
2	26,6	10	7,7	20	ohne Fe-Zusatz *6,1* in 60 Minuten + 0,00017 mg Fe *22,7* in 60 Minuten	1600
3	24,8	10	7,7	20	ohne Fe-Zusatz *3,7* in 60 Minuten + 0,0001 mg Fe *11,2* in 60 Minuten	1300
4	42,3	10	7,7	20	ohne Fe-Zusatz *3,4* in 60 Minuten + 0,0002 mg Fe *25,3* in 60 Minuten	1800

Natürlich hängt die Beschleunigung, die ein bestimmter Eisenzusatz zur Folge hat, ganz von der Reinheit des Cysteinpräparates ab, und es ist deshalb nicht sachgemäß, eine Beziehung zwischen Oxydationsbeschleunigung und Konzentration des zugesetzten Eisens zu suchen. Folgen wir aber hierin MATHEWS und WALKER, so finden wir beispielsweise (Versuch 4 der Tabelle), daß die Oxydationsgeschwindigkeit durch einen Eisenzusatz von $3{,}6 \cdot 10^{-7}$ Molen Fe pro Liter auf das Siebenfache ansteigt. Viel geringer war die Oxydationsbeschleunigung in den Versuchen von MATHEWS und WALKER — eben weil ihre Präparate unreiner waren —, indem ein Eisenzusatz von 10^{-5} Molen Fe pro Liter die Oxydationsgeschwindigkeit nur verdoppelte[1].

X. Die chemische Natur der Verunreinigungen,

die in den Präparaten anderer Forscher waren, anzugeben, ist natürlich unmöglich. Wenn aber, was anzunehmen ist, MATHEWS und WALKER sowie DIXON und TUNNICLIFFE analysenreine Präparate in Händen gehabt haben, so können die fraglichen Verunreinigungen nicht wohl etwas anderes gewesen sein als Schwermetalle. Bedenkt man, daß

[1] MATHEWS u. WALKER, l. c., S. 299ff.

das destillierte Wasser des Laboratoriums vielfach Kupfer enthält, daß Gläser Eisen und Mangan abgeben, und daß in keiner der zitierten Arbeiten Vorsichtsmaßregeln in dieser Hinsicht mitgeteilt werden, so kann man fast mit Sicherheit sagen, daß die bisher beschriebenen Präparate mit Metall verunreinigt waren

Die Verunreinigung meiner eigenen Präparate dagegen kann ich angeben Sie war immer und ausschließlich Eisen. Hatte ich nämlich ein unreineres, sich relativ schnell oxydierendes Präparat, so konnte ich aus der Oxydationsgeschwindigkeit und dem Werte von n_{Fe} berechnen, wieviel Eisen das Präparat enthalten mußte unter der Voraussetzung, daß Eisen allein die wirksame Verunreinigung war Tat ich das und bestimmte dann das Eisen in der Asche des Präparates, so war die Übereinstimmung ausgezeichnet.

XI. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Durch Reinigung des Cysteins erhält man Präparate, die sich 250- bis 100mal so langsam oxydieren als die in der Literatur beschriebenen. Was bisher als „Autoxydation" des Cysteins beschrieben worden ist, war — zum mindesten zu 99% — nichts anderes als eine Oxydationskatalyse durch Verunreinigungen

2. Mit Hilfe der Cysteinkatalyse können Eisenmengen nachgewiesen werden, die mit den gewöhnlichen analytisch-chemischen Methoden nicht mehr erkennbar sind

3 Die Hemmung der Cysteinoxydation durch Blausäure war der einzige Fall, in dem Blausäure die Oxydation eines metallfreien Systems antikatalytisch zu hemmen schien[1] Auch dieser Fall ist nunmehr als Eisenkatalyse erkannt

---

[1] Vgl hierzu die Arbeiten, die E Abderhalden über die Zellatmung geschrieben hat (Arch f d ges Physiol. **197** bis **199**, 1922 23) Ihr Inhalt wird durch die vorliegende Untersuchung widerlegt Dasselbe gilt von den Betrachtungen H. Wielands (Oppenheimers Handb d Biochemie, 2 Aufl, II. 252 1923) über die Oxydation des Cysteins und die Hemmung der Oxydation durch Blausäure

Biochem. Zeitschr. 142, 518. 1923

Über die Grundlagen der Wielandschen Atmungstheorie.

Von

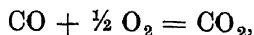
Otto Warburg.

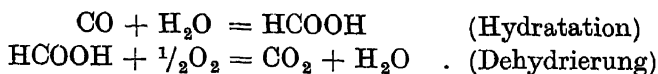
(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 19 September 1923)

I.

Nach einem Versuch von WIELAND verlauft die Oxydation des Kohlenoxyds nicht nach der Gleichung

$$CO + \frac{1}{2} O_2 = CO_2,$$

sondern nach den Gleichungen

$$CO + H_2O = HCOOH \qquad \text{(Hydratation)}$$
$$HCOOH + {}^1/_2 O_2 = CO_2 + H_2O \quad . \quad \text{(Dehydrierung)}$$

Diesen Fall betrachtet WIELAND als Beispiel der allgemeinen Regel, daß die Oxydation der Kohlenstoffverbindungen durch Abgabe von Wasserstoff, nicht durch Aufnahme von Sauerstoff erfolge[1].

Ist die Verallgemeinerung erlaubt, so ist die Sauerstoffatmung eine Folge von Hydratationen und Dehydrierungen, und zwar, wenn man die Bilanz ins Auge faßt, von Dehydrierungen durch molekularen Sauerstoff. Dann beschrankt sich das Problem der Atmung auf die Frage in welcher Weise katalysiert die Zellsubstanz die Dehydrierung?

Hier bestehen zunachst, welches auch der Mechanismus der Katalyse sein mag, drei Moglichkeiten. es kann der Wasserstoff der organischen Molekule durch die Zellsubstanz aktiviert werden, es kann der molekulare Sauerstoff aktiviert werden, oder es kann beides zugleich geschehen WIELAND entscheidet sich fur die erste Moglichkeit, nimmt also an, daß es der Wasserstoff ist, der durch die Zellsubstanz aktiviert werde, und zwar ausschließlich der Wasserstoff, wahrend der Sauerstoff als solcher — als molekularer Sauerstoff — mit dem Wasserstoff reagiere Diese Annahme ist der Inhalt der WIELANDschen Atmungstheorie[2].

---

[1] WIELAND, H.: Ber d deutsch. chem. Ges. 45, 484, 679, 685, 2606 1912; 46, 3327 1913; 47, 2085. 1914; 54, 2353. 1921.

[2] DERSELBE, ebendaselbst 55, 3639. 1922; Ergebn. d Physiol 20, 477. 1922; Oppenheimers Handb d. Biochem , 2. Aufl., 2, 252 1923.

Sucht man nach chemischen Analogien, so verweist WIELAND auf die Palladiumkatalysen. Palladiummetall[1] vermag organischen Molekulen Wasserstoff zu entziehen und den aufgenommenen Wasserstoff so weit zu aktivieren, daß er bei niedriger Temperatur mit molekularem Sauerstoff reagiert. Doch ist es WIELAND nicht gelungen, in der Zelle eine Substanz von der wasserstoffaktivierenden Eigenschaft des Palladiummetalls aufzufinden, und hierin lag von vornherein das Unbefriedigende seiner Theorie Denn die Einführung der wasserstoffaktivierenden Fermente war nur ein umschreibender Ausdruck fur die Annahme, daß der Wasserstoff durch die Zelle aktiviert werde.

II.

Eine andere Theorie der Atmung hat der Verfasser entwickelt[2]. Nach ihr ist der Katalysator der Atmung das Eisen, ein Element, das in kleinen Mengen in jeder Zelle als lebenswichtiger Bestandteil vorkommt. Eisen, der Zellsubstanz oder einfachen chemischen Systemen zugesetzt, vermag die Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und organischen Molekulen zu katalysieren, wobei Geschwindigkeiten der Oxydation beobachtet werden, die im Vergleich zur Menge des zugesetzten Eisens außerordentlich groß sind In der Tat genugt der minimale Eisengehalt der Zelle, um den Sauerstoffverbrauch intensiv atmender Zellen zu erklaren

Was den Mechanismus der Eisenkatalysen anbetrifft so ist er zwar von Fall zu Fall verschieden, insoweit aber immer gleich als eine niedrige Oxydationsstufe des Eisens mit dem Oxydationsmittel die hierbei entstehende hohere Oxydationsstufe mit dem Substrat der Oxydation reagiert wobei sich die niedrige Oxydationsstufe des Eisens zuruckbildet

Das Oxydationsmittel der Atmung ist der molekulare Sauerstoff die Primarreaktion der Atmung die Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und Eisen und nur in dieser Reaktion nicht mit den organischen Molekulen vermag der molekulare Sauerstoff in der Zelle zu reagieren Binden wir das Eisen der Zelle durch Blausaure so hort die Sauerstoffabsorption auf obwohl Blausaure weder mit dem molekularen Sanerstoff noch mit den organischen Molekulen reagiert und ihre wirksame Menge auch gar nicht ausreichen wurde um diese beiden Reaktionsteilnehmer in nennenswertem Betrage zu verandern

III.

Ein Vergleich beider Theorien lehrt, daß sie, was die Reaktionsweise des molekularen Sauerstoffs anbetrifft, in unvereinbarem Gegensatz

---

[1] WIELAND, H.: Chem Ber 47, 2085. 1914.

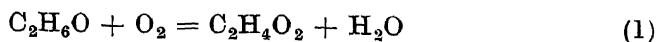
[2] WARBURG, O: diese Zeitschr 119, 134. 1921, 136, 266 1923; Zeitschr. f. Elektrochem. 1922, S. 70.

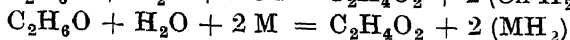
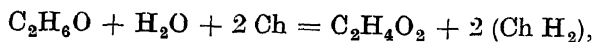
stehen Nach der ersten Theorie reagiert der molekulare Sauerstoff direkt mit dem Wasserstoff der organischen Molekule, nach der zweiten Theorie ausschließlich mit dem Eisen Die erste Theorie sieht in der Aktivierung des Wasserstoffs die wesentliche Wirkung der Zellsubstanz, die zweite Theorie laßt die Frage, ob neben dem Sauerstoff[1] auch Wasserstoff aktiviert werde, als ungeklart beiseite

Da es für die Entwicklung eines Gebietes schadlich ist, wenn zwei sich gegenseitig ausschließende Theorien nebeneinander bestehen, so wird man versuchen, eine Entscheidung zugunsten der einen oder der anderen Theorie herbeizufuhren Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich es unternommen, den Gedankengang der WIELANDschen Theorie nachzuprufen und werde im folgenden zeigen, daß WIELANDS Schlüsse nicht nur nicht bindend, sondern, soviel ich sehe, unrichtig sind.

IV.

Essigbakterien katalysieren die Reaktion zwischen Athylalkohol und molekularem Sauerstoff zu Essigsaure, ein Vorgang, dessen Bilanzgleichung lautet.

$$C_2H_6O + O_2 = C_2H_4O_2 + H_2O \qquad (1)$$

WIELAND fand[2], daß der molekulare Sauerstoff ersetzt werden kann durch Chinon oder Methylenblau. Bezeichnen wir Chinon mit Ch, Methylenblau mit M, so haben wir an Stelle von (1) die Bilanz-Gleichungen.

$$C_2H_6O + H_2O + 2\,Ch = C_2H_4O_2 + 2\,(Ch\,H_2),$$
$$C_2H_6O + H_2O + 2\,M = C_2H_4O_2 + 2\,(MH_2)$$

Platinschwarz katalysiert die Reaktion zwischen Athylalkohol und molekularem Sauerstoff zu Essigsaure WIELAND fand[3], daß auch hier der molekulare Sauerstoff ersetzt werden kann durch Chinon oder Methylenblau

Aus diesen Versuchen zieht WIELAND den Schluß, daß durch den Katalysator — die Zellsubstanz oder das Platin — der Wasserstoff des Athylalkohols aktiviert werde, nicht aber das Oxydationsmittel, weder das Methylenblau, noch das Chinon, noch — was das Wichtigste ist — der molekulare Sauerstoff. Beispielsweise schreibt er[4]·

„Die katalytische Oxydation von Alkohol durch Platin, die zuerst von SCHONBEIN beobachtet worden ist, geschieht nicht durch Sauerstoffaktivierung Es

[1] Unter „Aktivierung“ des Sauerstoffs verstehen wir alle Vorgänge, in denen aus molekularem Sauerstoff und einem anderen Stoff ein Oxydationsmittel entsteht, das schneller reagiert als molekularer Sauerstoff. Das Oxydationspotential bleibt hier ganz außer Betracht.

[2] WIELAND, H.: Chem. Ber. 46, 3327. 1913.

[3] DERSELBE: Ebendaselbst 45, 484. 1912.

[4] DERSELBE: Oppenheimers Handb d. Biochem., 2. Aufl., 2, 252 1923.

ist der Wasserstoff des Alkohols, der durch den Katalysator reaktionsfähig gemacht wird, und der in diesem Zustande den molekularen Sauerstoff über die Phase des Hydroperoxyds zu Wasser hydriert. Beweis: Die Reaktion erfolgt in gleicher Weise ohne Gegenwart von Sauerstoff, wenn statt seiner ein anderer Wasserstoffakzeptor verwendet wird, z. B. Chinon oder Methylenblau."

Zunächst ist zu bemerken, daß wir es mit Oberflächenreaktionen zu tun haben, im Modellversuch mit Alkohol, der an Platin gebunden ist, und mit den Oxydationsmitteln, Methylenblau, Chinon oder Sauerstoff, die an Platin gebunden sind. Alle diese Stoffe werden durch die Bindung an den Katalysator verändert, und man kann, wenn man im Sinne WIELANDs an das Problem herangeht, nur fragen: Welche Veränderung ist für den Eintritt der Reaktion wesentlicher, die Veränderung des Alkohols oder die Veränderung der Oxydationsmittel? WIELAND antwortet: die Veränderung des Alkohols, offenbar indem er den Umstand für beweisend hält, daß drei durchaus verschiedene Oxydationsmittel dasselbe Endprodukt der Oxydation, die Essigsäure, liefern.

Dieser Schluß erscheint in keiner Weise bindend. Stellen wir uns auf den entgegengesetzten Standpunkt und betrachten als die wesentliche Wirkung des Katalysators die Veränderung der Oxydationsmittel, so haben wir drei verschiedene Oxydationsmittel, die die Hydroxylgruppe des Alkohols zur Carboxylgruppe oxydieren, die schwerer oxydierbare CH_3-Gruppe jedoch nicht angreifen. Beispiele, daß verschiedene Oxydationsmittel ein organisches Molekül zu demselben Endprodukt oxydieren — und zwar in homogener Lösung, wo von einer Aktivierung des organischen Moleküls keine Rede sein kann — sind in so großer Zahl bekannt, daß die zweite Erklärung der ersten zum mindesten nicht unterlegen ist.

Dies vorausgeschickt, fragt es sich, ob wir über die Veränderung der Reaktionsteilnehmer durch den Katalysator in den zur Diskussion stehenden Fällen irgend etwas aussagen können, was über das Hypothetische hinausgeht. Diese Frage ist zu bejahen für den Fall, daß der Katalysator Platin, das Oxydationsmittel Sauerstoff ist.

Wir wissen, daß Platin molekularen Sauerstoff nicht nur durch unspezifische Oberflächenkräfte bindet, sondern, wie das elektromotorische Verhalten von Platin in Sauerstoff zeigt, durch sehr erhebliche chemische Kräfte. Hierbei wird der Sauerstoff aktiviert; mit Sauerstoff behandeltes Platin zeigt Superoxydreaktionen[1]. Bedenkt man dies, so wird man gerade den Schluß, auf den WIELANDs Beweisführung zielt, verwerfen müssen. Oxydieren wir Alkohol mit Sauerstoff an Platin, so ist es nicht der molekulare Sauerstoff, sondern der Sauerstoff eines

[1] ENGLER u. L. WÖHLER: Zeitschr. f. anorgan. Chem. 29, 1. 1902; L. WÖHLER, Chem. Ber. 36, 3475. 1903.

Platinoxyds oder Superoxyds, der mit dem Alkohol reagiert, eine Auffassung, die in keiner Weise durch die Tatsache berührt wird, daß wir den Alkohol auch mit Chinon oder Methylenblau oxydieren können.

Die Nachprüfung des WIELANDschen Gedankenganges an dem Beispiel der Platinkatalyse zeigt, wie wenig bindend, ja wie willkürlich seine Schlüsse sind. Insbesondere ist die sauerstofflose Oxydation kein Argument, das irgend etwas aussagt über die Reaktionsweise des molekularen Sauerstoffs, weder im Fall der Platinkatalyse, noch in einem anderen Fall.

V.

Muskelgewebe katalysiert die Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und Bernsteinsäure zu Fumarsäure. THUNBERG fand[1], daß der molekulare Sauerstoff ersetzt werden kann durch Methylenblau, wobei als Reduktionsprodukt an Stelle des Wassers Leucomethylenblau erscheint, für WIELAND ein Beweis, daß der molekulare Sauerstoff durch Muskelgewebe nicht aktiviert wird. In diesem Fall jedoch liegt ein Versuch[1] vor, der WIELANDS Deutung ausschließt.

Bringt man nämlich in die Muskelsubstanz eine kleine Menge Blausäure, so wird zwar die Oxydation durch molekularen Sauerstoff, nicht aber die Oxydation durch Methylenblau gehemmt. Folgen wir der Deutung WIELANDS, so haben wir in dem blausäurehaltigen Gewebe, da Methylenblau reduziert wird, aktiven Wasserstoff. Wir haben in dem blausäurehaltigen Gewebe, wenn wir es mit Sauerstoff sättigen, außerdem molekularen Sauerstoff, so daß alle Bedingungen zum Eintritt der WIELANDschen Reaktion gegeben sind. Indessen findet sich, daß eine Reaktion nicht eintritt, Bernsteinsäure in blausäurehaltigem Gewebe ist gegenüber Sauerstoff beständig. Dies beweist — soweit es Beweise in der Naturwissenschaft gibt — daß WIELANDS Deutung falsch ist.

Dabei liegt die richtige Deutung auf der Hand. Blausäure bindet das Eisen und verhindert damit die Aufnahme des molekularen Sauerstoffs. Sie verhindert aber nicht die Oxydation durch Methylenblau, weil dieser Vorgang mit Eisen nichts zu tun hat. Methylenblau, Chinon und ähnliche Körper verhalten sich in der Zelle nicht wie molekularer Sauerstoff, sondern wie molekularer Sauerstoff + Eisen, d. h. wie aktivierter Sauerstoff.

VI.

Die fundamentale Tatsache, daß Blausäure die Atmung hemmt, ist im allgemeinen sowohl als auch mit Hinblick auf die sauerstofflose

[1] THUNBERG, T.: Skand. Arch. f. Physiol. 35, 163. 1917; vgl. dazu auch C. L. EVANS, Cyanide Anoxaemia, Journ. of Physiol. 53, 17. 1919.

Oxydation der WIELANDschen Atmungstheorie ungünstig. WIELAND äußert nun neuerdings die Auffassung[1], die Wirkung der Blausäure auf die Atmung sei etwas Sekundäres. Blausäure hemme nicht das Atmungsferment, sondern die Katalase. So komme es zu einer Anhäufung von Wasserstoffsuperoxyd in der Zelle und schließlich zu einer Vergiftung des Atmungsferments.

Niemand, der die Wirkung der Blausäure auf die Atmung gesehen hat, kann diese Theorie in Erwägung ziehen. Die Wirkung der Blausäure setzt sofort in dem durch die Blausäurekonzentration gegebenen Maße ein, sie nimmt mit der Zeit nicht zu, und sie ist bei Zimmertemperatur vollkommen reversibel. Wäre WIELANDs Auffassung richtig, so würde die Wirkung der Blausäure bei konstanter Blausäurekonzentration mit der Zeit zunehmen und sie wäre irreversibel. Sie wäre ferner nicht bestimmt durch die Konzentration der Blausäure, sondern außerdem abhängig von dem Flüssigkeitsvolumen, in dem wir die Zellen suspendieren. Denn lebende Zellen sind für Wasserstoffsuperoxyd permeabel. Niemals ist der Austritt von Wasserstoffsuperoxyd aus einer blausäurehaltigen lebenden Zelle nachgewiesen worden.

Die Theorie geht aus von der ersten unbewiesenen Annahme, Wasserstoffsuperoxyd sei ein Zwischenprodukt der Atmung, von der zweiten unbewiesenen Annahme, etwa gebildetes Wasserstoffsuperoxyd könne im Atmungsprozeß nicht reduziert werden, und von einer dritten unbewiesenen Annahme über die Rolle der Katalasen. Da es keinen Versuch gibt, der die Theorie begründet, und keine Konsequenz der Theorie, die zutrifft, so soll sie in der Folge nicht mehr berücksichtigt werden[2].

---

[1] WIELAND, H., Chem. Ber. **55**, 3639, 1922; Ergebn. d. Physiol. **20**, 477, 1922; Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **2**, 252, 1923.

[2] *Zusatz beim Neudruck.* Der letzte Passus hat in einer Zeit, die auch da, wo es um die Wahrheit geht, Kompromisse wünscht, Entrüstung hervorgerufen. Es geht klar aus der Stelle, an der der inkriminierte Passus steht, hervor, daß er sich nicht auf alle Theorien von WIELAND bezieht, sondern nur auf die Theorie der Blausäurewirkung. Diese Theorie hat man seitdem allgemein fallen gelassen, so daß erreicht wurde, was beabsichtigt war.

Biochem. Zeitschr 145, 461. 1924.

Über die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen.

Von

Otto Warburg und Walter Brefeld.

(Eingegangen am 9. Januar 1924.)

Mit 3 Abbildungen.

Die vorliegende Arbeit[1] erbringt den Nachweis, daß die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle eine Eisenkatalyse ist, und bestätigt damit die früher gegebene Theorie des Kohlemodells[2]

Einteilung.

I. Vorbemerkung über das Kohlemodell.

Die Oxydation der Aminosäuren an Blutkohle ist unvollständig Cystin liefert Kohlensäure, Ammoniak und Schwefelsäure, jedoch nur 20% Kohlensäure, 30% Ammoniak und 10% Schwefelsäure der bei totaler Verbrennung entstehenden Mengen, und nimmt nur 30% des für totale Verbrennung berechneten Sauerstoffs auf. Leucin verbraucht 17% des für totale Verbrennung berechneten Sauerstoffs und liefert 17% Kohlensäure und 74% Ammoniak

---

[1] Zur Ausführung dieser Arbeit wurden uns Mittel aus der Hoshi-Stiftung zur Verfügung gestellt. Dem Japanausschuß der deutschen Notgemeinschaft sprechen wir auch hier unseren Dank aus.

[2] Warburg, O · Physikalische Chemie der Zellatmung, diese Zeitschr. 119, 134. 1921.

Bei der Oxydation des Leucins an Blutkohle entsteht, wie bei der Oxydation des Leucins durch Wasserstoffsuperoxyd[1], Valeraldehyd, dessen Geruch sich bald nach dem Mischen von Leucinlösungen mit Kohle bemerkbar macht. Valeraldehyd seinerseits oxydiert sich weiter an Blutkohle

Aminosäuren, in denen die Aminogruppe an ein tertiäres Kohlenstoffatom gebunden ist, werden an Blutkohle sehr viel langsamer oxydiert als primäre und sekundäre Aminosäuren[2] Es ist bemerkenswert, daß tertiäre Aminosäuren auch von Wasserstoffsuperoxyd[2] sehr viel langsamer angegriffen werden als primäre und sekundäre.

II. Maß der katalytischen Wirkung.

Zur Prüfung unserer Kohlepräparate benutzen wir Leucin, und zwar KAHLBAUMsche d, l-Isobutylaminoessigsäure, die aus heißem Wasser umkristallisiert wird In 10 ccm einer n/20 (0,65 proz.) Leucinlösung tragen wir — je nach der Wirksamkeit der Kohlepräparate — 20—400 mg Kohle ein, sättigen mit atmosphärischer Luft und schütteln bei 38° im Thermostaten Die Druckänderung am angeschlossenen Barcroftmanometer, die von 20 zu 20 Minuten eine Stunde lang abgelesen wird, ergibt, da ein Einsatz mit Alkali die Kohlensäure absorbiert, die Geschwindigkeit der Oxydation Hierbei sind die Kohlemengen und die Versuchszeiten so gewählt, daß sich die Leucinkonzentration weder durch die Adsorption noch durch den chemischen Umsatz erheblich ändert Was beobachtet wird, ist also die Wirkung von Kohle, die im Gleichgewicht steht mit einer ungefähr n/20 Leucinlösung und mit Sauerstoff vom Drucke feuchter atmosphärischer Luft

Den beobachteten Sauerstoffverbrauch reduzieren wir auf die Gewichtseinheit Kohle und die Zeiteinheit, indem wir als Einheiten das Kubikmillimeter Sauerstoff, das Milligramm Kohle und die Stunde benutzen Wir bilden also den Quotienten

$$\frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Kohle} \times \text{Stunden}}$$

bezeichnen ihn mit Q und messen durch ihn die katalytische Wirksamkeit unserer Kohlepräparate

III. Vergleich des Adsorptionsvermögens.

In eine n/20 Leucinlösung tragen wir so viel Kohle ein, daß eine 2 proz. Kohlesuspension entsteht schütteln 5 Minuten bei etwa 10°

---

[1] Über den Abbau von Aminosäuren durch Wasserstoffsuperoxyd vgl. C. NEUBERG: Beitr. z chem. Physiol. u. Pathol. 2, 238. 1902; diese Zeitschr. 20, 531. 1909. — DAKIN: Journ. of biol. Chem. 4, 63. 1909.

[2] NEGELEIN, E.: diese Zeitschr. 142, 493. 1923.

und ermitteln die aus der Losung durch Adsorption herausgenommene Leucinmenge titrimetrisch nach SORENSEN[1]. Die Zeit von 5 Minuten genügt zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes und ist andererseits so kurz, daß der chemische Umsatz die Adsorptionsmessung nicht stort

Die prozentische Abnahme des Leucintiters gibt einen fur unsere Zwecke ausreichenden Maßstab des Adsorptionsvermogens, doch muß man bedenken, daß diese Abnahmen nicht im Verhaltnis der Adsorptionskonstanten stehen, weil die Endkonzentrationen an Leucin nicht gleich sind

IV. Der Ausgangspunkt der Untersuchung.

Wir tragen in 100 ccm einer n/20 Leucinlösung 2 g Blutkohle ein und messen die Adsorption des Leucins durch Formoltitration Wir wiederholen den Versuch mit dem Unterschiede, daß wir der Leucinlosung $^1/_{2000}$ bis $^1/_{20000}$ Mol. Blausaure pro Liter zusetzen und finden, daß in beiden Fallen die gleiche Menge Leucin adsorbiert wird Gleichwohl hemmt Blausaure die Oxydation des Leucins, und zwar n/2000 Blausaure fast vollstandig

Titrieren wir bei dem Versuche nicht nur das Leucin, sondern auch die Blausäure — was mit Silbernitrat sehr genau moglich ist —, so erhalten wir ein Bild von den an der Oberflache herrschenden Verhaltnissen im Zustande der Blausaurehemmung Wir erfahren, daß 1 Mol Blausaure, neben 1000 Mol Leucin an der Kohle adsorbiert, die Oxydation des Leucins merklich verlangsamt, 1 Mol Blausaure, neben 100 Mol Leucin an der Kohle adsorbiert, die Oxydation des Leucins fast vollstandig hemmt

Dieser einfache Versuch[2] erlaubt den wichtigen Schluß, daß nur ein kleiner Teil der Kohleoberflache katalytisch wirksam ist Denn indem Blausaure einen kleinen Teil der Kohleoberflache bedeckt, inaktiviert sie die gesamte Oberflache Leucin, an dem Hauptteil der Oberflache adsorbiert, ist gegenuber Sauerstoff bestandig, ein Resultat, das unwiderleglich erscheint und das den Gang unserer Untersuchung bestimmt hat. Wir haben uns gesagt, daß die Oberflache der Blutkohle aus einer adsorbierenden Grundsubstanz besteht, die katalytisch unwirksam ist, und aus einer in sie eingelagerten Substanz, die katalytisch wirksam ist, und haben uns zunächst die Aufgabe gestellt, einen derartigen Katalysator — eine „kunstliche Blutkohle“ — aus einheitlichen Stoffen in übersichtlichen Schritten aufzubauen

[1] SORENSEN, S P. L. · diese Zeitschr. 7, 45 1908.

[2] WARBURG, O.: Über die antikatalytische Wirkung der Blausaure, diese Zeitschr. 136, 266 1923.

V. Zuckerkohle.

Nach dem Gesagten kann ein homogenes, in allen Teilen gleichartiges Adsorbens nicht die Eigenschaften der Blutkohle besitzen Ein homogenes Adsorbens erhalt man, wenn man reinen Rohrzucker unter Zusatz von Kaliumcarbonat in einen glühenden Tiegel eintragt etwa eine Stunde lang erhitzt und dann mit Salzsaure und Wasser extrahiert

Zuckerkohle, auf die beschriebene Art hergestellt, nimmt bei der Adsorptionsprobe 17% des Leucins aus der Losung heraus, Blutkohle unter sonst gleichen Bedingungen 30%. Zuckerkohle adsorbiert also recht gut, wenn auch schlechter als Blutkohle.

Zuckerkohle ist autoxydabel und aktiviert molekularen Sauerstoff. Da Aminosauren von aktiviertem Sauerstoff leicht angegriffen werden, so ubertragt Zuckerkohle auf die an ihrer Oberflache adsorbierten Aminosäuren Sauerstoff Hierbei erscheint in der umgebenden Flussigkeit Wasserstoffsuperoxyd, ein Reaktionsprodukt, das bei der Oxydation der Aminosauren durch Blutkohle nicht oder wenigstens nicht in nachweisbaren Mengen auftritt Die katalytische Wirksamkeit der Zuckerkohle ist geringer als die der Blutkohle, aber von derselben Großenordnung[1]

Die katalytische Wirksamkeit der Zuckerkohle wird durch chemisch indifferente Stoffe — Alkohole, Urethane — gehemmt, um so starker, je starker diese Stoffe adsorbiert werden Gegen chemisch indifferente Stoffe also verhalt sich die Zuckerkohle wie Blutkohle oder auch wie die lebendige Substanz, und wollte man nur das Zusammenspiel unspezifischer Oberflachenkräfte und irgendwelcher chemischer Krafte nachahmen wie es der lebendigen Substanz eigentumlich ist so ware das System Zuckerkohle-Aminosaure ein brauchbares Modell Mit Sauerstoff gesattigte Zuckerkohle mag man sich vorstellen als eine peroxydartige Verbindung des Kohlenstoffs an die die Aminosauren durch Oberflachenkrafte angelagert und von der sie durch chemisch indifferente Stoffe verdrangt werden

Doch fehlt hier die spezifische Reaktion auf Blausaure Eine n 1000 Blausaure die Blutkohle sowohl als auch die lebendige Substanz inaktiviert, laßt die Wirksamkeit der Zuckerkohle intakt Wir mussen daraus schließen daß die in der Zuckerkohle wirkenden chemischen Krafte anderer Art sind als die in der Blutkohle oder der lebendigen Substanz wirkenden

---

[1] *Zusatz beim Neudruck* E K RIDEAL hat meine Versuche mit Kohle nachgepruft und bestätigt Doch ist sein Satz ein Irrtum: „WARBURG was of the opinion that the catalytically active areas in charcoal consisted of iron-carbon-nitrogen complexes neither carbon nor carbon admixed with iron possessing any sensible catalytic activity.“ (Journ. Chemical Soc. 1926, p 1813).

VI. Silicatzuckerkohle.

Wurde der Kohlenstoff der Blutkohle, wie der Kohlenstoff der Zuckerkohle, katalytisch wirken, so wäre, was auch sonst noch an der Blutkohle vor sich gehen mag, die Wirkung der Blausäure unverständlich. Denn immer mußte ein durch Blausäure nicht hemmbarer Rest, eben die katalytische Wirkung des Kohlenstoffs, übrig bleiben. Da dies nicht geschieht, so ist zu untersuchen, wodurch sich der Kohlenstoff der Blutkohle von dem Kohlenstoff der Zuckerkohle unterscheidet.

Es liegt nahe, hier an die anorganischen Stoffe zu denken, die die Technik bei der Verkohlung des Blutes zusetzt, in erster Linie an Kieselsäure, von der MERCKsche Blutkohle etwa 10% enthält. In der Tat, setzt man dem Zucker bei der Verkohlung neben Kaliumcarbonat noch Kaliumsilicat zu und verfahrt weiter, wie bei der Darstellung der silicatfreien Zuckerkohle, so erhält man eine kieselsäurehaltige Kohle, die die interessante und von uns gesuchte Eigenschaft besitzt, Aminosäuren zwar zu adsorbieren, jedoch nicht katalytisch zu wirken. Leucin, an der Oberfläche dieser Kohle adsorbiert, ist gegenüber Sauerstoff beständig.

Silicatzuckerkohle nimmt bei der Adsorptionsprobe 16% Leucin aus der Lösung heraus, Zuckerkohle 17%, Blutkohle 30%. Silicatzuckerkohle adsorbiert also schlechter als Blutkohle, aber ebensogut wie Zuckerkohle.

Warum unter der Einwirkung des Silicats katalytisch unwirksamer Kohlenstoff entsteht, können wir nicht erklären. Zunächst glaubten wir, in der Silicatkohle sei der Kohlenstoff durch eine Kieselsäurehaut geschützt. Doch war diese Annahme unrichtig, denn durch Abrauchen mit Flußsäure auf dem Wasserbade kann die Kieselsäure aus der Kohle entfernt werden, ohne daß sich die Eigenschaften des Kohlenstoffs ändern, insbesondere ohne daß er katalytisch wirksam wird.

Die Gewinnung der gut adsorbierenden, katalytisch unwirksamen Kohle war ein wesentlicher Schritt auf dem Wege zur Darstellung der künstlichen Blutkohle. Denn es war offenbar, daß wir hier die Grundsubstanz der Blutkohle in Händen hatten, die zu aktivieren nunmehr unsere weitere Aufgabe war.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 1.

VII. Aktivierung der Silicatzuckerkohle.

Daß die katalytisch wirksame Substanz der Blutkohle nur in kleinen Mengen in der Blutkohle enthalten ist, folgt aus dem Blausäureversuch, den wir an die Spitze des Ganzen gestellt haben. Sucht man nach einer derartigen Substanz, so richtet sich die Aufmerksamkeit auf das

Eisen, das, aus dem Blutfarbstoff stammend, ein nie fehlender Bestandteil der Blutkohle ist Seine Menge betragt einige Milligramm pro Gramm Kohle Bedenkt man, daß Eisen in vielen einfachen chemischen Systemen Oxydationen katalysiert, ferner, daß Blausäure leicht mit Eisen reagiert, so gewinnt der Gedanke, die katalytisch wirksame Substanz der Blutkohle sei eine Eisenverbindung, an Wahrscheinlichkeit. Gegen ihn spricht in keiner Weise die Tatsache, daß freie Eisenionen ohne Wirkung auf gelöste Aminosauren sind. Denn die chemischen Wirkungen der Elemente sind verschieden je nach der Form, in der sie vorliegen

Setzt man bei der Darstellung der Silicatzuckerkohle Eisensalz zu, so findet sich, daß die eisenhaltigen Kohlen katalytisch ebenso unwirksam sind wie die eisenfreien Kohlen Das Eisen in derartigen Kohlen ist durch Salzsaure nur zum Teil extrahierbar und liegt in ihnen wahrscheinlich als Eisensilicat vor

Wendet man andererseits das Silicatverfahren auf getrocknetes Blut an, so erhalt man immer wirksame Kohlen von den Eigenschaften der technischen Blutkohlen Man sieht daraus, daß nicht irgendein unbekanntes technisches Verfahren die gesuchten Eigenschaften hervorbringt, sondern Bestandteile des Blutes, und gibt man, trotz der geschilderten negativen Versuche mit Eisensalz, den Gedanken an das Eisen nicht auf, so ist zu uberlegen, in welcher Form das Eisen im Blute vorliegt

Trager des Bluteisens ist der Blutfarbstoff, aus dem eine kristallisierte Pyrroleisenverbindung, das NENCKIsche Hamin gewonnen werden kann Hamin besitzt die Zusammensetzung $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ und enthalt 8,5% Eisen Setzt man bei der Bereitung der Silicatzuckerkohle eine kleine Menge Hamin zu, so erhalt man in der Tat Kohlen von der katalytischen Wirksamkeit der Blutkohle, die außerdem die Eigenschaft der Blutkohle besitzen durch kleine Mengen Blausaure inaktiviert zu werden Damit war die Aufgabe eine kunstliche Blutkohle“ aufzubauen, gelost

Eine graphische Darstellung mag die wichtigen Versuche veranschaulichen In den Abb 1 und 2 bedeuten die Abszissen die Versuchszeiten *t* in Minuten, die Ordinaten die zur Zeit *t* auf Leucin ubertragenen Sauerstoffmengen in Kubikmillimetern Fur jeden dargestellten Versuch wurde die gleiche Menge Kohle, namlich 200 mg, und die gleiche Menge n/20 Leucinlosung, namlich 10 ccm, verwendet.

Abb. 1 zeigt das Verhalten der Silicatzuckerkohlen Die Kurve der ohne Hämin hergestellten Kohle (Kurve I) verlauft auf der Abszissenachse, zu keiner Zeit ist ein Verbrauch an Sauerstoff wahrnehmbar. Setzt man bei der Darstellung der Kohle auf 100 g Rohrzucker

0,2 g Hämin zu, so ist die entstehende Kohle (Kurve II) fast von der katalytischen Wirksamkeit der MERCKschen Blutkohle, ihr Wirkungsquotient ist 0,7 gegenüber 1,0 für MERCKsche Blutkohle Ein Zusatz von 2 g Hamin zu 100 g Rohrzucker bewirkt (Kurve III), daß die entstehende Kohle etwa dreimal wirksamer ist als technische Blutkohle

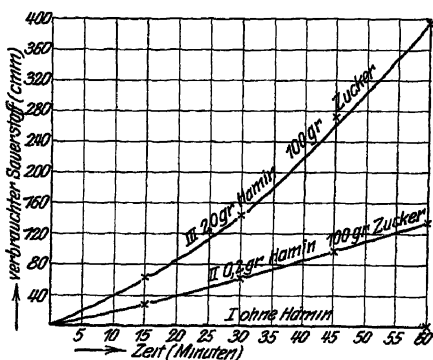



Abb 1 Je 200 mg Silicatzuckerkohle + 10 ccm n/20 Leucinlosung 38° Gasraum Luft

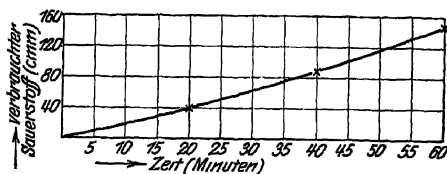



Abb 2 200 mg MERCKsche Blutkohle + 10 ccm n/20 Leucinlosung 38° Gasraum Luft

Abb 2 zeigt das Verhalten der MERCKschen Blutkohle Sie ist im gleichen Maßstab gezeichnet wie Abb 1, so daß die fur gleiche Zeiten ausgezogenen Ordinaten beider Abbildungen im Verhaltnis der Wirkungsquotienten stehen

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 2

VIII. Häminkohle.

Die Aktivierung durch Hamin wachst mit steigenden Haminmengen, und zwar nicht proportional dem zugesetzten Hamin, sondern langsamer Die wirksamsten Kohlen, die man mit Hilfe von Hamin erhalt, sind Kohlen aus reinem Hamin.

Haminkohle stellen wir her durch Eintragen von Hamin in einen glühenden Porzellantiegel Wir extrahieren dann mit heißer Salzsaure und wiederholen das Gluhen Der großte Teil des Hamineisens wird hierbei zu metallischem Eisen reduziert und geht bei der Extraktion mit Salzsaure aus der Kohle heraus. Es bleibt, mit einer Ausbeute von etwa 30% des Hamingewichtes, eine Kohle, die neben Kohlenstoff einige Prozente Stickstoff und einige Prozente Eisen enthalt

Haminkohle ist katalytisch sieben- bis zehnmal wirksamer als technische Blutkohle Gleichwohl adsorbiert sie außerordentlich schlecht, bei der Adsorptionsprobe nimmt sie nur 1—2% des Leucins aus der Lösung heraus, wahrend Blutkohle 30% herausnimmt. Haminkohle verhält sich also umgekehrt wie Silicatzuckerkohle. Silicatzuckerkohle adsorbiert gut und wirkt nicht, Haminkohle adsorbiert kaum und wirkt

sehr stark. Auf adsorbiertes Leucin umgerechnet, ist Haminkohle 100—300 mal wirksamer als technische Blutkohle.

Fügen wir hinzu, daß Haminkohle durch n/1000 Blausäure inaktiviert wird, so ist der Blausäureversuch, von dem wir ausgingen, vollkommen durchsichtig. Da der Katalysator nur in kleiner Menge in der Grundsubstanz der Blutkohle enthalten ist und außerdem rund 20 mal schlechter adsorbiert als die Grundsubstanz, so inaktiviert Blausäure die Blutkohle ohne nachweisbare Wirkung auf die Adsorption.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 3.

IX. Kohlen aus Anilinfarbstoffen.

Wir haben bisher die Frage, worauf die große katalytische Wirksamkeit der Haminkohle beruht, offen gelassen. Um sie zu entscheiden, haben wir uns zunächst die Aufgabe gestellt, andere Stoffe zu finden, die Kohlen von der Wirksamkeit der Haminkohle liefern. Hierbei brauchten wir auf die geringe katalytische Wirksamkeit des autoxydabeln Kohlenstoffs keine Rücksicht zu nehmen, da sie im Vergleich zur Wirksamkeit der Haminkohle klein ist. Wirkt doch Haminkohle etwa 30 mal stärker als autoxydabler Kohlenstoff, und auf die adsorbierten Leucinmengen umgerechnet, 500 mal stärker. So war es nicht mehr notwendig, mit Silicat zu verkohlen, sondern die zu prüfenden Stoffe wurden einfach als solche oder mit etwas Kaliumcarbonat im Tiegel geglüht.

Unter den Substanzen, die bei diesem Verfahren Kohlen liefern — alle flüchtigen Substanzen scheiden natürlich aus — sind zwei Klassen zu unterscheiden, solche, deren Kohlen stickstoffhaltig sind und solche, deren Kohlen es nicht sind. Nur die ersteren sind katalyptisch wirksam. Reich an Stickstoff und besonders wirksam sind Kohlen aus gewissen Anilinfarbstoffen wie Indulinen, Safraninen und komplizierteren Azokörpern. Aus käuflichen Farbstoffpräparaten hergestellt sind diese Kohlen sogar noch wirksamer als Haminkohle und besitzen wie die Haminkohle die Eigenschaft, durch n/1000 Blausäure inaktiviert zu werden.

Tabelle 1.

Kohle aus	N-Gehalt der Kohle %	Wirkungsquotient Q[1]	Fe-Gehalt der Kohle %
Hamin	3,0	7—10	2,5
Indulin Grübler	7,1	13,4	0,19
Safranin Grübler	10,2	18,2	0,13
Neutralrot Grübler	10,2	13,6	0,10
Bismarckbraun Grübler	10,0	13,8	0,15

[1] Q für technische Blutkohle ist etwa gleich 1.

Einige Zahlen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In der ersten Spalte steht der Name der Substanz, aus der die Kohle hergestellt wurde, in der zweiten der Stickstoffgehalt der Kohle, in der dritten der Wirkungsquotient *Q*, in der letzten Spalte der Eisengehalt der Kohlen.

Was den Eisengehalt der Kohlen anbetrifft, so stammt das Eisen der Häminkohle aus dem Häminmolekül, das Eisen der übrigen Kohlen aus Verunreinigungen der technischen Farbstoffpräparate. Man erkennt aus der Tabelle, daß eine Vermehrung des Eisengehaltes von einigen Zehntel Prozenten auf einige Prozente jedenfalls keine Vermehrung der Wirkung bedingt, daß es sich also, wenn überhaupt das Eisen für die Wirkung wesentlich ist, um Mengen handelt, die um $^1/_{10}$% oder darunter liegen.

Während es schwer ist, aus Hämin eisenfreies Hämatoporphyrin zu gewinnen, ist es verhältnismäßig leicht, Anilinfarbstoffe herzustellen, deren Eisengehalt sehr klein ist. Wir beschränkten uns auf Versuche mit Bismarckbraun, dem am leichtesten zugänglichen Farbstoff der Tabelle, und untersuchten, ob Kohle aus Bismarckbraun, wenn man von einem reineren Farbstoff ausgeht, weniger wirksam ist als Kohle aus technischem Bismarckbraun.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 4.

X. Aktivierung durch Eisen.

Um eisenarmes Bismarckbraun herzustellen, fällen wir, wenn die Diazotierung des m-Phenylendiamins beendigt ist, den Farbstoff nicht nach der technischen Vorschrift mit Natriumchlorid aus, sondern durch Einleiten von Salzsäure. Auf diese Weise gewinnen wir Bismarckbraun, dessen Eisengehalt von der Größenordnung $^1/_{100}$ mg pro Gramm ist, und daraus Kohlen, deren Eisengehalt von der Größenordnung $^1/_{10}$ mg pro Gramm ist. Es findet sich, daß diese Kohlen erheblich unwirksamer sind als die aus dem technischen Bismarckbraun hergestellten Kohlen, und was entscheidend ist, daß wir mit Hilfe von Eisensalz die eisenarmen Kohlen aktivieren können. Dazu genügt es, die Kohle mit wenig Eisenchlorid zu tränken, zu glühen und mit Salzsäure zu extrahieren.

Einige Zahlenbeispiele sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Wir erkennen aus ihnen, daß ein Anstieg des Eisengehaltes von der Größenordnung 0,01% auf 0,1% einen Anstieg der katalytischen Wirkung auf das Acht- bis Zehnfache bedingt, wobei die katalytische Wirkung langsamer ansteigt als der Eisengehalt. Die Ausschläge sind sehr groß und beweisen unwiderleglich, daß Eisen imstande ist, aus wässeriger Lösung adsorbierte Aminosäuren katalytisch zu oxydieren. Eine

Tabelle 2.

Versuch	Kohle	Eisengehalt der Kohle %	Katalytische Wirksamkeit Q[1]
1	vor Eisenzusatz	0,008	0,8
	nach „	0,25	20
2	vor „	0,009	2,4
	nach „	0,2	20
3	vor „	0,006	1,9
	nach „	0,13	16,0

graphische Darstellung des wichtigen Aktivierungsversuches findet man in Abb. 3 des folgenden Abschnittes.

Der Vorgang der Aktivierung durch Eisensalz vollzieht sich in zwei Phasen. Erhitzt man die Kohle kurze Zeit mit Eisensalz auf schwache Rotglut, so ist ein Teil des Eisens so weit säurefest gebunden, daß es bei einstundigem Erwärmen mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade nicht extrahierbar ist. Doch genugt dies nicht, damit das Eisen katalytisch wirke. Erst bei weiterem und sehr starkem Glühen erfolgt die Aktivierung des Eisens.

Ist der Eisengehalt der Kohle auf einige Zehntel Prozent gebracht worden, so kann durch weiteren Eisenzusatz die Wirkung nicht mehr gesteigert werden. Es spielt also die Verdünnung des Eisens in dem festen Körper eine merkwürdige Rolle, die an das Verhalten der Schwermetalle in den LENARDschen Phosphoren erinnert[2].

Stickstofffreie Kohlen können in ähnlicher Weise durch Eisen nicht aktiviert werden. Glüht man stickstofffreie Kohlen mit Eisensalz und kocht dann mit Salzsäure, so geht das gesamte Eisen aus der Kohle wieder heraus, und die geringen Wirkungen, die man erzielt[3], wenn nach dem Glühen die Kohle mit Salzsäure nicht extrahiert wird, hängen wahrscheinlich irgendwie mit der Selbstoxydation des reduzierten Eisens zusammen.

Unter diesen Umständen liegt der Schluß nahe, das Eisen in den stickstoffhaltigen Kohlen sei an den Stickstoff gebunden. Wir wollen diesen Schluß ziehen, uns also vorstellen, die katalytisch wirksame Eisenverbindung sei eine Verbindung von Eisen, Stickstoff und Kohlen-

[1] Q für technische Blutkohle ist etwa gleich 1.

[2] Nach PH. ELLINGER (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **123**, 246. 1922) übertragen LENARDsche Phosphore auf Aminosäuren in ähnlicher Weise Sauerstoff wie Blutkohle. Es ist uns nicht gelungen, die ELLINGERschen Beobachtungen zu wiederholen. Wir möchten deshalb den Wunsch aussprechen, daß ELLINGER die in der angezogenen Mitteilung veröffentlichten Versuche nachprüft.

[3] WARBURG, O.: diese Zeitschr. **119**, 150. 1921.

stoff, in der das Eisen an den Stickstoff gekettet ist — Bemerkenswerterweise ist hier das Eisen nicht durch beliebige Schwermetalle vertretbar, weder Kupfer, noch Kobalt, noch Mangan vermag stickstoffhaltige Kohlen zu aktivieren.

Kohle aus Bismarckbraun nimmt bei der Adsorptionsprobe etwa 4% Leucin aus der Losung heraus gegenuber 30%, die technische Blutkohle herausnimmt Dabei ist es gleichgültig, ob die Bismarckbraunkohle mit Eisen aktiviert ist oder nicht. Auch hier zeigt sich, daß ein Zusammenhang zwischen der Adsorption, die wir messen, und der katalytischen Wirkung nicht besteht

Mit Eisen aktivierte Bismarckbraunkohle ist katalytisch 20mal wirksamer als technische Blutkohle und, auf die adsorbierten Leucinmengen umgerechnet, 160mal wirksamer

Abb 3 Je 20 mg Kohle + 10 ccm Losung I Kohle nicht aktiviert, in reiner n/20 Leucinlosung II Kohle, mit Eisen aktiviert, in reiner n/20 Leucinlosung III Kohle, mit Eisen aktiviert, in n/20 Leucin-, n/1000 Blausaurelosung

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 5

XI. Hemmung der Eisenkatalyse durch Blausäure.

Die Wirkung der durch Eisen aktivierten Kohle denken wir uns aus zwei Teilwirkungen zusammengesetzt aus der Zunahme der Wirkung, die das Eisen hervorbringt, und aus dem Rest, der Wirkung der nicht aktivierten Kohle Ist auch der Rest eine Eisenkatalyse — was wahrscheinlich ist —, so ist unsere Trennung unberechtigt Doch kommt es uns hier darauf an, einen Vorgang naher zu untersuchen, der ganz unzweifelhaft eine Eisenkatalyse ist, und als solchen trennen wir die Zunahme der Wirkung, die beim Gluhen mit Eisen erfolgt, von der schon vorher vorhandenen Wirkung ab Wird diese Zunahme durch kleine Konzentrationen von Blausaure gehemmt?

In Abb. 3 sehen wir einen Versuch graphisch dargestellt. Als Abszissen sind die Versuchszeiten t aufgetragen, als Ordinaten die zur Zeit t auf Leucin ubertragenen Sauerstoffmengen Kurve I zeigt die Sauerstoffübertragung durch nicht aktivierte Kohle, Kurve II die Sauerstoffubertragung nach der Aktivierung, Kurve III die Sauerstoffüber-

tragung durch aktivierte Kohle, wenn die Lösung neben $^1/_{20}$ Mol Leucin $^1/_{1000}$ Mol Blausäure enthält. Wir erkennen, daß die ganze Wirkung des Eisens unter dem Einfluß der Blausäure verschwindet. Dieser Versuch bildet den Schluß der ganzen Untersuchung, er beweist, daß die Wirkung der Blausäure eine Wirkung auf das Eisen der Kohle ist.

Belege zu diesem Abschnitt findet man im experimentellen Teil unter Ziffer 5.

XII. Reaktionsfähigkeit des Eisens.

Wir betrachten wiederum nur die Zunahme der Wirkung, die bei der Aktivierung durch Eisen eintritt, reduzieren diese Zunahme auf die Gewichtseinheit zugesetzten Eisens und erhalten so ein Maß für die Reaktionsfähigkeit des an die Kohle gebundenen Eisens. Aus Versuch 3 der Tabelle 2 ergibt sich, daß 1 mg Eisen, der Kohle zugesetzt, pro Stunde 11000 cmm Sauerstoff auf Leucin überträgt oder 1 Atom Eisen pro Stunde 27 Mol Sauerstoff. Nehmen wir an, daß der Primärvorgang in der Reaktion eines Atoms Eisen mit einem Molekül Sauerstoff besteht, so reagiert in etwa 2 Minuten jedes Eisenatom einmal mit Sauerstoff. Es sei erwähnt, daß Eisen in der komplexen Cysteinverbindung noch erheblich reaktionsfähiger ist[1], indem hier, wenn wir dieselbe Annahme über den Primärvorgang machen, jedes Eisenatom in 12 Sekunden einmal mit Sauerstoff reagiert.

Unsere Rechnung ergibt nur einen Minimalwert für die Reaktionsfähigkeit des an Kohle gebundenen Eisens, denn sie beruht auf der Voraussetzung, das bei der Aktivierung gebundene Eisen werde beim Glühen quantitativ in die katalytisch wirksame Form übergeführt. Gerade dies aber ist wenig wahrscheinlich, vielmehr vermuten wir, daß sich beim Glühen ein Gleichgewicht zwischen wirksamer und unwirksamer Form einstellt und daß die Menge an wirksamem Eisen im Vergleich zur Gesamtmenge des Eisens immer klein ist.

XIII. Bau der technischen Blutkohle.

Nach dem, was wir in den vorhergehenden Abschnitten erfahren haben, ist es nunmehr leicht, sich ein Bild von der Entstehung und dem Bau der technischen Blutkohle, soweit er für uns von Interesse ist, zu machen.

Der Katalysator der Blutkohle ist Eisen, gebunden an Stickstoff, wobei es nicht notwendig ist, daß der gesamte eisenbindende Stickstoff aus dem Hämin stammt. An dem Beispiel der aus Anilinfarbstoffen hergestellten Kohlen haben wir gesehen, daß Stickstoff verschiedener Herkunft imstande ist, Eisen in eine katalytisch wirksame Form überzuführen.

---

[1] Warburg, O. u. Seishi Sakuma: Arch. f. d. ges. Physiol. **200**, 203. 1923; diese Zeitschr. **142**, 68. 1923.

Die Grundsubstanz der Blutkohle ist Kohlenstoff, durch Behandlung mit Kieselsaure katalytisch unwirksam gemacht

Vor der inaktivierenden Wirkung der Kieselsaure bleibt die katalytisch wirksame Eisenverbindung verschont. Daß dies so ist, beweist das Verhalten der Haminkohle, die durch Kieselsaure nicht inaktiviert werden kann Warum es so ist, bleibe dahingestellt

XIV. Experimenteller Teil.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs benutzen wir Gefaße, wie sie in dieser Zeitschrift 142,70 abgebildet sind Das Volumen der Gefaße ist 30 ccm Je 10 ccm Kohlesuspension werden in den Hauptraum, 1 ccm 5proz Kalilauge in den Einsatz eingefullt Der Gasraum enthält atmospharische Luft Die Gefaßkonstante fur Sauerstoff ist ungefahr 2, was bedeutet, daß eine Druckänderung von 1 mm einen Sauerstoffverbrauch von 2 cmm anzeigt

Neben einem mit Wasser beschickten Gefaß — dem Thermobarometer — wird immer ein mit Kohle und Wasser beschicktes Gefaß eingehangt, das ebensoviel Kohle enthalt wie die Versuchsgefaße. Dieses Gefaß ergibt die „Selbstoxydation" der Kohle, eine Große, die von dem Sauerstoffverbrauch der leucinhaltigen Kohlesuspensionen abzuziehen ist

Die Selbstoxydation einer sachgemaß hergestellten Kohle aus Hamin oder aus Anilinfarbstoffen ist im Vergleich zur Sauerstoffubertragung zu vernachlassigen Denn 1 mg Kohle, in Wasser suspendiert, verbraucht pro Stunde etwa 0,5 cmm Sauerstoff, wahrend die gleiche Kohlenmenge in der gleichen Zeit 10—20 cmm Sauerstoff auf Leucin ubertragt Es sind deshalb in den Protokollen die Selbstoxydationen, die sich auf diese Kohlen beziehen, nicht gesondert angeführt, sondern die verbrauchten Sauerstoffmengen immer abzuglich der Selbstoxydation angegeben

Bei Versuchen mit technischer Blutkohle und mit „kunstlicher" Blutkohle dagegen — also den katalytisch weniger wirksamen Kohlen — ist die Selbstoxydation gesondert angeführt

1 *Silicatzuckerkohle*

Darstellung: 100 g Rohrzucker, mit 15 g Kaliumcarbonat und 15 g Kaliumsilicat fein zerrieben, werden in einen gluhenden Tiegel in kleinen Portionen eingetragen, wobei man jedesmal wartet, bis die Entwicklung der Dämpfe beendigt ist Dann wird 40 Minuten lang bei bedecktem Tiegel auf Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten mit verdünnter heißer Salzsaure gekocht, filtriert und mit heißem Wasser saurefrei gewaschen. Ausbeute 12—16 g.

Adsorption der Silicatzuckerkohle. 0,6 g Kohle werden mit 30 ccm n/20 Leucinlösung geschüttelt. Nach 5 Minuten wird filtriert und im Filtrat das Leucin nach SÖRENSEN titriert.

20 ccm Leucinlösung vor dem Schütteln mit Kohle . . . 5,07 ccm n/5 NaOH
20 ccm Kohlefiltrat . . . . 4,24 ccm n/5 NaOH

Durch die Kohle herausgenommen 0,83 ccm n/5 NaOH oder 16% des Leucins.

38° Gasraum Luft.

Zeit Min.	200 mg Kohle, 10 ccm Wasser cmm O_2	200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin cmm O_2
15	7	6
30	15	14
45	22	21
60	28	28

Sauerstoffübertragung. Es wird also in der Leucinlösung nicht mehr Sauerstoff verbraucht als in Wasser, d. h. kein Sauerstoff auf Leucin übertragen. Dabei ist die „Selbstoxydation" der Kohle gering, nämlich pro Milligramm Kohle und Stunde 0,14 cmm, während die Selbstoxydation der ohne Silicat hergestellten Kohle[1] pro Milligramm Kohle und Stunde 0,5 cmm Sauerstoff beträgt.

2. *Aktivierung durch Hämin.*

Die Darstellung der Hämin-Silicat-Zuckerkohle geschieht wie die der Silicatzuckerkohle mit dem Unterschied, daß dem Gemisch von Rohrzucker, Kaliumsilicat und Kaliumcarbonat vor dem Zerreiben Hämin zugesetzt wird.

Aktiviert wurde mit zwei verschiedenen Mengen Hämin, nämlich mit 0,2 g Hämin auf 100 g Rohrzucker und mit 2 g Hämin auf 100 g Rohrzucker.

Sauerstoffübertragung durch die aktivierten Kohlen.

a) Kohle aus 100 g Rohrzucker + 0,2 g Hämin. 38° Gasraum Luft.

Zeit Min.	1 200 mg Kohle, 10 ccm Wasser cmm O_2	2 200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausäure cmm O_2	3 200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin cmm O_2	4 200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausäure, n/20 Leucin cmm O_2
15	11	16	42 (31)	23 (7)
30	26	31	88 (62)	45 (14)
45	37	46	134 (97)	68 (22)
60	49	62	184 (135)	91 (29)

[1] WARBURG, O.: Über die antikatalytische Wirkung der Blausäure, diese Zeitschrift 136, 266. 1923.

In der Tabelle sind die nicht eingeklammerten Zahlen die direkt beobachteten Sauerstoffabsorptionen Die eingeklammerten Zahlen sind die mit Hilfe der Spalten 1 und 2 korrigierten Werte und bedeuten die Sauerstoffubertragung auf Leucin

Der Wirkungsquotient[1] in der reinen Leucinlosung ist $\frac{135}{200} = 0{,}68$, in der blausaurehaltigen Leucinlösung $\frac{29}{200} = 0{,}15$. Die Hemmung durch n/1000 Blausaure ist also $\frac{0{,}68 - 0{,}15}{0{,}68} = 78\%$

b) Kohle aus 100 g Rohrzucker + 2 g Hamin 38°. Gasraum Luft.

Zeit	1	2	3	4
	200 mg Kohle, 10 ccm Wasser	200 mg Kohle, 10 ccm n/1000 Blausaure	200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin	200 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausaure
Min.	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2
15	14	9	77 (63)	24 (15)
30	24	18	168 (144)	48 (30)
45	34	29	309 (275)	77 (48)
60	44	38	439 (395)	102 (58)

Der Wirkungsquotient in der reinen Leucinlosung ist $\frac{395}{200} = 1{,}98$, in der blausaurehaltigen Leucinlosung $\frac{58}{200} = 0{,}29$ Die Hemmung durch n/1000 Blausaure betragt also $\frac{1{,}98 - 0{,}29}{1{,}98} = 86\%$

3 *Darstellung und Eigenschaften der Haminkohle*

Hamin gewinnen wir nach WILLSTATTER und FISCHER[2] Rinderblutzellen werden durch Waschen mit 0,9proz Kochsalzlosung von Serum befreit. 700 ccm der moglichst konzentrierten Zellsuspension, die mit Luft bis zur Sattigung geschuttelt worden ist, fließen im Laufe von 30 Minuten in 2 Liter siedenden Eisessig, der etwa 10 g Kochsalz gelost enthält. Dann wird noch 10 Minuten zum Sieden erhitzt, im Laufe von 15 Minuten 1 Liter Wasser zugegeben und einen Tag stehengelassen Von den Haminkristallen gießt man ab, wascht auf der Nutsche zuerst mit 50proz. Essigsaure, dann mit Wasser und trocknet.

Zur Darstellung der Kohle tragen wir 2 g Hamin in kleinen Portionen in einen gluhenden Porzellantiegel ein Wir lassen die entweichenden

[1] Der Wirkungsquotient für MERCKsche Blutkohle ist etwa 1,0

[2] Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol Chem. 87, 458. 1913

Dämpfe sich entzünden und warten mit weiterem Zusatz von Hämin jedesmal so lange, bis keine Dämpfe mehr entweichen. Ist alles Hämin eingetragen, so glühen wir 30 Minuten in bedecktem Tiegel in der Flamme eines starken Teclubrenners, die den Tiegel von allen Seiten umgibt, extrahieren dann eine halbe Stunde mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade und glühen nochmals eine Stunde in der Flamme des Teclubrenners. Der Tiegel soll dabei hell rotglühend werden, auf seinem Boden soll die Kohle in einer Höhe von wenigen Millimetern ausgebreitet sein.

Die Ausbeute an Kohle bei diesem Verfahren beträgt 0,65 g oder 33% des Hämingewichtes.

Zur Bestimmung des Eisens[1] in der Häminkohle glühen wir etwa 200 mg im offenen Porzellantiegel, nehmen den rotbraunen Rückstand mit konzentrierter eisenfreier Salzsäure unter Zusatz einiger Kristalle Kaliumchlorat auf, verdampfen zur Trockne, bringen den Rückstand mit verdünnter Salzsäure auf ein Volumen von 25 ccm, tragen 0,5 g Kaliumjodid ein, lassen im Dunkeln 20 Minuten stehen und titrieren das ausgeschiedene Jod mit n/10 Thiosulfat, das aus einer in 1/50 ccm geteilten Burette zufließt. 1 ccm n/10 Thiosulfat = 5,6 mg Eisen.

Man findet so einen Eisengehalt von einigen Prozenten. Stickstoff bestimmen wir nach DUMAS, wobei die Kohle sehr schwer, erst bei Weißglut, verbrennt. Beispielsweise wurden folgende Werte erhalten: aus 0,2273 g Kohle 5,9 ccm Stickstoff (18°, 759 mm über 33% KOH) oder 3% Stickstoff.

Adsorption des Leucins durch Häminkohle. 30 ccm etwa n/20 Leucin werden mit 0,6 g Häminkohle geschüttelt. Titration nach SÖRENSENS Formolmethode.

20 ccm Lösung vor Zusatz der Kohle 5,10 n/5 NaOH
20 ccm des Kohlefiltrats 5,03 n/5 NaOH

Aus der Lösung herausgenommen 0,07 ccm n/5 NaOH = 1,4%.

Sauerstoffübertragung durch Häminkohle.

38° Gasraum Luft

Zeit Min.	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin cmm O_2	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 HCN cmm O_2
20	54	6,4
40	107	12,8
60	159	20,0

[1] Vgl. TREADWELL, Quantitative Analyse.

Wirkungsquotient Q in reiner Leucinlosung $\left(\frac{\text{cmm}}{\text{mg} \times \text{Std.}}\right)$ 8,0.

Wirkungsquotient Q in blausaurehaltiger Leucinlosung $\left(\frac{\text{cmm}}{\text{mg} \times \text{Std}}\right)$ 1,0

$$\text{Hemmung durch Blausaure } \frac{159 - 20}{159} = 86\%.$$

Unregelmaßigkeiten Im allgemeinen lag der Wirkungsquotient Q der Haminkohlen zwischen 7 und 10 Doch sind im Laufe der Arbeit zwei Unregelmaßigkeiten vorgekommen, die hier mitgeteilt seien Eine Kohle, die nach dem zweiten Gluhen noch 4 Stunden lang auf dem Wasserbade mit n-Salzsaure extrahiert worden war, gab den niedrigen Wirkungsquotienten von 1 Die Stickstoffbestimmung nach DUMAS zeigte, daß der Gehalt an Stickstoff auffallend niedrig war, namlich nur 0,65%. Es scheint also, daß langes Extrahieren mit Salzsaure schadlich ist — Eine Kohle, fur die im Juli Q gleich 8 gefunden war, erwies sich nach 3 Monaten als katalytisch unwirksam, konnte jedoch durch einstundiges Gluhen wieder bis zu dem Werte 8 aktiviert werden

4 *Darstellung und Eigenschaften der Kohlen aus Anilinfarbstoffen*

Die verwendeten Farbstoffe waren von GRUBLER bezogene Praparate, das Indulin „wasserlosliches" Indulin Bekanntlich sind die kauflichen Farbstoffe mit großen Mengen Salz, meist Kochsalz, vermengt Es scheint, daß ein gewisser Salzgehalt — an Kaliumchlorid oder Natriumchlorid oder Kaliumcarbonat — nicht nur nicht schadet, sondern die Entstehung einer wirksamen Kohle sogar begunstigt

Die Darstellung der Kohlen geschah nach der fur Haminkohle gegebenen Vorschrift mit dem Unterschied, daß nach dem zweiten Gluhen nochmals eine halbe Stunde mit n-Salzsaure auf dem Wasserbade extrahiert wurde

Den Eisengehalt der Kohlen bestimmten wir kolorimetrisch nach LACHS und FRIEDENTHAL[1], den Stickstoffgehalt nach DUMAS Die Kohlen verbrennen sehr schwer

In der nebenstehenden Tabelle findet man einige Angaben uber die chemische Zusammensetzung derartiger Kohlen, soweit sie fur uns von Interesse ist, sowie uber ihren Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucinlosung, fur zwei Kohlen, die Indulin- und die Safraninkohle, außerdem eine Messung des Sauerstoffverbrauchs in blausaurehaltiger Leucinlosung

5. *Aktivierung der Bismarckbraunkohle durch Eisen*

Darstellung des Farbstoffes. 30 g Meta-Phenylendiamin werden mit 390 ccm n-Salzsäure und Wasser auf 1 Liter gebracht Unter Kuhlung

[1] LACHS u FRIEDENTHAL: diese Zeitschr. 32, 130. 1911.

38°. Gasraum Luft.

Kohle aus	O_2-Verbrauch in reiner Leucinlösung cmm O_2	O_2-Verbrauch in blausäurehaltiger Leucinlösung cmm O_2	Hemmung durch Blaus.
Indulin Fe: 0,19% N: 0,0863 g gaben 5,3 ccm N bei 17° u. 755 mm Hg = 7,1%	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 134. $Q = 13.4$	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausäure in 20′ 16. $Q = 1.6$	91%
Safranin Fe: 0,13% N: 0,1479 g gaben 12,9 ccm N bei 17° und 762 mm Hg = 10,2%	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 182 $Q = 18.2$	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin, n/1000 Blausäure in 20′: 26. $Q = 2.6$	86%
Neutralrot Fe: 0,1% N: 0,0521 g gaben 4,6 ccm N bei 17° und 757 mm Hg = 10,2%	20 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 90. $Q = 13.6$	nicht bestimmt	
Bismarckbraun Fe 0,15% N. 0,1003 g gaben 8,6 ccm N bei 15° und 755 mm Hg = 10,0%	30 mg Kohle, 10 ccm n/20 Leucin in 20′: 138 $Q = 13.8$	nicht bestimmt	

mit Eis tropft man eine Lösung von 12,8 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser hinzu, erhitzt nach beendigter Diazotierung kurze Zeit auf dem Wasserbade, kühlt mit Eis und leitet Salzsäuregas ein bis über dem entstandenen braunen Niederschlag eine hellgelbe Lösung steht. Man saugt auf der Nutsche ab, wäscht mit verdünnter eisenfreier Salzsäure nach und trocknet zunächst über Kaliumhydroxyd im Vakuumexsikkator, später bei 120° bis kein Geruch nach Salzsäure mehr wahrnehmbar ist. Ausbeute etwa 30 g.

Darstellung der Kohle. Wir verreiben 2 g des Farbstoffes mit 0,5 g Kaliumchlorid oder Kaliumcarbonat, tragen das Gemisch in kleinen Portionen in einen glühenden Porzellantiegel ein, wobei die entweichenden Dämpfe sich entzünden, glühen dann bei bedecktem Tiegel eine halbe Stunde, lassen abkühlen, extrahieren 30 Minuten mit n-Salzsäure auf dem Wasserbade und waschen mit heißem Wasser nach, bis die saure Reaktion verschwunden ist. Ausbeute 30% vom Gewicht des Farbstoffes.

Aktivierung der Kohle. Wir tränken 300 mg Kohle mit 1 ccm einer Eisenchloridlösung, die 1 mg Eisen im Kubikzentimeter enthält, trocknen den gut verrührten Kohlebrei auf dem Wasserbade, glühen eine

Stunde in einem kleinen bedeckten Porzellantiegel, der ın dıe Flamme eines starken Teclubrenners versenkt ist, extrahieren auf dem Wasserbade eine Stunde lang mıt n-Salzsaure und waschen mit heißem Wasser saurefrei Beim Extrahıeren mıt Salzsaure geht eın Teıl des Eisens aus der Kohle wieder heraus, dıe Halfte bis zweı Drittel des Eisens bleibt in der Kohle zuruck, die nach der beschriebenen Behandlung 1½ bis 2½ mg Eisen pro Gramm enthält.

Zur Kontrolle behandeln wır 300 mg desselben Kohlepraparates ın der gleichen Weise mıt dem Unterschıede, daß wir nicht mit Eisen tranken Die Kontrollkohle ıst also ebenso lange und ebenso stark

38° Gasraum Luft.

Versuch	Kohle ohne Eısenzusatz		Kohle mıt Eisenzusatz		
	Fe-Gehalt %	Sauerstoffverbrauch ın n/20 Leucin-losung	Fe-Gehalt %	Sauerstoffverbrauch ın n/20 Leucin-losung	Sauerstoffverbrauch in n/20 Leucin, n/1000 Blausaure-losung
1	0,008	30 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 4,8 cmm 20′: 8,0 „	0,25	30 mg Kohle 10 ccm Losung 10′. 104 cmm 20′· 196 „	—
2	—	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 3,2 cmm 20′. 6,4 „ 30′ 11,2 cmm	—	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′· 27,2 cmm 20′: 57,5 „ 30′· 88,0 „	—
3	—	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′ 4,0 cmm 20′ 8,8 „ 30′ 14,4 „	0,25	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 51,0 cmm 20′: 102,0 „ 30′: 150,4 „	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′ 4,1 cmm 20′ 5,8 „ 30′: 8,8 „ d. ı 94% Hemmung
4	—	20 mg Kohle 10 ccm Lösung 10′ 3,2 cmm 20′ 6,4 „ 30′ 9,6 „	—	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 33,6 cmm 20′: 67,2 „ 30′: 97,6 „	—
5	0,009	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′· 8,0 cmm 20′ 16.0 „	0,25	20 mg Kohle 10 ccm Lösung 10′: 69 cmm 20′: 130 „	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 3,2 cmm 20′: 5,6 „ d i 96% Hemmung
6	0,006	20 mg Kohle 10 ccm Lösung 10′: 6,9 cmm 20′: 11,2 „ 30′: 19,2 „	0,13	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 48 cmm 20′: 105 „ 30′: 161 „	20 mg Kohle 10 ccm Losung 10′: 3,3 cmm 20′: 8,5 „ 30′: 13,9 „ d. i 92% Hemmung

gegluht und ebenso mit Salzsaure und Wasser gewaschen wie die mit Eisenchlorid getrankte Kohle. Daß der Effekt der Eisenbehandlung durch das Eisen und nicht etwa durch das Chlor des Eisenchlorids hervorgebracht wird, beweist die Tatsache, daß Kupfer- oder Kobalt- oder Manganchlorid ohne Wirkung sind, wenn wir sie in gleicher Weise mit Kohle in Reaktion treten lassen

Wir haben sechs Versuche mit sechs verschiedenen, aus Bismarckbraun hergestellten Kohlen gemacht und immer einen großen Anstieg der katalytischen Wirkung gefunden, nämlich, nach Ausweis der vorstehenden Tabelle, einen Anstieg auf das 20fache (Versuch 1), auf das 8fache (Versuch 2), auf das 11fache (Versuch 3), auf das 10fache (Versuch 4), auf das 8fache (Versuch 5) und auf das 8fache (Versuch 6). Versuch 6 ist der in Abb 3, Abschnitt XI, graphisch dargestellte.

In drei Versuchen wurde der Eisengehalt der nicht aktivierten Kohle bestimmt und von der Größenordnung (vgl Tabelle) 0,01% gefunden In vier Versuchen wurde der Eisengehalt der aktivierten Kohle bestimmt und zu (vgl Tabelle) 0,13 bis 0,25% gefunden.

In drei Versuchen wurde die Wirkung der n/1000 Blausäure (Versuche 3, 5 und 6 der Tabelle) auf die katalytische Wirkung der aktivierten Kohle quantitativ verfolgt und eine Hemmung von 94% (Versuch 3) von 96% (Versuch 5) und von 92% (Versuch 6) gefunden. Versuch 6 ist der in Abb 3 Abschnitt XI graphisch dargestellte.

Adsorption des Leucins durch aktivierte und nicht aktivierte Kohle

Nicht aktivierte Kohle, Eisengehalt 0,006% 0,3 g Kohle mit 15 ccm n/20 Leucinlosung geschuttelt filtriert und nach SORENSEN titriert

10 ccm Leucinlosung vor dem Schutteln mit Kohle	2,97 ccm n/5 NaOH
10 ccm Kohlefiltrat .	2,85 ccm n/5 NaOH

Aus der Losung herausgenommen 0,12 ccm n/5 NaOH oder 4%

Aktivierte Kohle Eisengehalt 0,25% 0 3 g Kohle mit 15 ccm n/20 Leucinlosung geschuttelt, filtriert und nach SORENSEN titriert

10 ccm Leucinlosung vor dem Schutteln mit Kohle	2,97 ccm n/5 NaOH
10 ccm Kohlefiltrat	2,85 ccm n/5 NaOH

Aus der Losung herausgenommen 0 12 ccm n/5 NaOH oder 4%

Biochem. Zeitschr. 146, 380. 1924

Über die Oxydation von Fructose in Phosphatlösungen.

Von
Otto Warburg und Muneo Yabusoe.

(Eingegangen am 16. Februar 1924.)

Mit 3 Abbildungen

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Fructose, in neutralem Phosphat gelost, autoxydabel ist Bei der Oxydation bildet sich Kohlensaure, und zwar etwa $^1/_3$ Mol pro Mol absorbierten Sauerstoffs

Glucose wird unter sonst gleichen Bedingungen von molekularem Sauerstoff nicht angegriffen Fructose nach unseren bisherigen Erfahrungen nur in Phosphatlosungen, nicht aber in Losungen anderer Salze Es handelt sich also um eine spezifische Reaktion zwischen Phosphat, Fructose und molekularem Sauerstoff[1]

I. Methoden.

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit bringen wir 5—10 ccm Fructoselosung in einen 30 ccm fassenden Atmungstrog (Form diese Zeitschr. 142, 70 1923), in den Einsatz des Atmungstroges 1 ccm 5 proz Kalilauge zur Absorption der gebildeten Kohlensaure Den Trog verbinden wir mit einem Barcroftmanometer, fullen Sauerstoff ein und schutteln im Thermostaten bei 38° Innerhalb einer Stunde zeigt dann das Manometer Druckanderungen, die von der Zusammensetzung und Menge der eingefullten Fructoselosung abhängen und bis zu 200 mm Wasser betragen Die Ausschlage sind also sehr groß und die Oxydationsgeschwindigkeiten genau meßbar Eine Druckänderung von 1 mm bedeutet einen Sauerstoffverbrauch von etwa 2 cmm

Soll neben dem Sauerstoffverbrauch auch die Kohlensaurebildung bestimmt werden, so beschicken wir drei Atmungstroge — I, II und III

[1] Wasserstoffsuperoxyd oxydiert Glucose, wie viele andere organische Substanzen, bei neutraler Reaktion, ein Vorgang, der nach W Loeb durch Phosphat begünstigt wird. Hier beruht die Wirkung der Phosphate, wie Harden und Henley gezeigt haben, auf nichts anderem als einer Pufferwirkung Phosphat kann durch beliebige andere Puffer ersetzt werden. Vgl. W. Loeb, diese Zeitschr. 29, 317 1910; 32, 43 u. 52. 1911; 46. 288. 1912 und Harden u Henley: The Biochem. Journ 16, 143 1922.

— mit je 2 ccm Fructoselösung derselben Zusammensetzung. In den Einsatz des Troges I füllen wir Kalilauge. Trog I dient zur Messung des Sauerstoffverbrauchs. In die Einsätze der Tröge II und III füllen wir dreifach normale Schwefelsäure, die Tröge II und III dienen zur Bestimmung der Kohlensäure. — Die drei Tröge werden gleichzeitig in den Thermostaten eingehängt und zunächst 10 Minuten zwecks Temperaturausgleich geschüttelt. Dann wird die Schwefelsäure des Troges III aus dem Einsatz in die Fructoselösung eingekippt, der entstehende positive Druck ergibt den Kohlensäuregehalt der Fructoselösung zu Beginn des Versuchs („präformierte Kohlensäure"). Die beiden anderen Tröge werden einige Stunden geschüttelt. Sind die Ausschläge an den Manometern hinreichend groß geworden, so liest man sie ab und kippt nun die Schwefelsäure des Troges II aus dem Einsatz in die Fructoselösung. Hierbei entsteht ein positiver Druck, der den Kohlensäuregehalt der Fructoselösung am Ende des Versuchs ergibt. Die während der Oxydationsmessung an den Gasraum des Troges II abgegebene Kohlensäure endlich erhält man aus der Differenz der Manometerablesungen für Trog I und II, so daß alle Daten zur Verfügung stehen, um die gebildete Kohlensäure zu berechnen. Näheres in bezug auf die Berechnung findet man in Abschnitt VI dieser Arbeit. Die Genauigkeit einer Kohlensäuremessung beträgt etwa 2% vom Werte.

Das Fructosepräparat, das wir benutzten, war „Lävulose I" von Kahlbaum, die wir zunächst aus Alkohol umkristallisierten. 0,1624 g gaben bei der Elementaranalyse 0,2397 g Kohlensäure und 0,0995 g Wasser, das sind 40,27% Kohlenstoff und 6,86% Wasserstoff (berechnet 40,0% Kohlenstoff und 6,7% Wasserstoff). Da sich zeigte, daß die Umkristallisation an den Eigenschaften, die wir untersuchten, nichts änderte, arbeiteten wir später mit dem nicht gereinigten Kahlbaumschen Präparat.

II. Zeitlicher Verlauf der Oxydation.

Um den zeitlichen Verlauf der Oxydation zu untersuchen, lösen wir 2 g Fructose in 90 ccm sekundärem und 10 ccm primärem m/1 Phosphat (p_H etwa 7,7), leiten durch die Lösung bei 38° Sauerstoff und entnehmen zu verschiedenen Zeiten je 10 ccm Lösung, deren Oxydationsgeschwindigkeit wir auf die oben geschilderte Weise bestimmen. Das Ergebnis eines derartigen Versuchs ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Aus Tabelle 1 ergibt sich, daß die Geschwindigkeit der Oxydation in den ersten Stunden schnell ansteigt und dann im Laufe von Tagen langsam absinkt. Durch Interpolation kann man berechnen, daß 10 ccm der Lösung oder 200 mg Fructose nach 3 Tagen etwa 30 mg Sauerstoff

Tabelle 1. 38° Gasraum Sauerstoff

Zeit nach Herstellung der Fructoselosung Stunden	In einer Stunde von 10 ccm Losung verbrauchter Sauerstoff cmm	Zeit nach Herstellung der Fructoselosung Stunden	In einer Stunde von 10 ccm Losung verbrauchter Sauerstoff cmm
1	242	24	320
2	345	48	212
3	375	72	204
4	410		

verbraucht haben, das sind 15% des Fructosegewichts Gleichzeitig hatte die Drehung der Losung um 13% des Anfangswertes abgenommen.

Nimmt man das Maximum der Oxydationsgeschwindigkeit, 410 cmm Sauerstoff pro Stunde, und bezieht das Gewicht des verbrauchten Sauerstoffs auf das Gewicht der Fructose, so findet man, daß pro Stunde bis 0,3% des Fructosegewichts an Sauerstoff verbraucht werden.

III. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Zur Herstellung verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen benutzen wir Phosphatgemische oder Gemische von Glykokoll mit Natronlauge, und zwar Glykokoll-Natronlauge in den von Soerensen angegebenen Konzentrationen, Phosphat jedoch in hoherer, im allgemeinen $^1/_1$-molarer Konzentration Mischt man $^1/_1$-molare Losungen von sekundarem und primarem Phosphat in demselben Verhaltnis wie die verdunnteren (m/15) Soerensenlosungen, so erhalt man nicht die gleichen Wasserstoffionenkonzentrationen, sondern die aus konzentriertem Phosphat hergestellten Losungen sind etwas saurer als die aus verdunntem Phosphat hergestellten

Wir haben die p_H-Werte unserer konzentrierten Phosphatlosungen nicht genauer gemessen Im folgenden bedeutet der p_H-Wert, der neben der Zusammensetzung der Gemische angegeben ist, den Exponenten der Soerensengemische fur 18°, der also nur angenahert mit dem p_H unserer Gemische, die bei 38° zur Anwendung kamen, ubereinstimmt

In dem Versuche der Tabelle 2 war Fructose gelost einerseits in einem Phosphatgemisch von Blutalkalitat, andererseits in Glykokoll-Natronlauge von 400—1000mal hoherer Alkalitat In der fast neutralen

Tabelle 2. 38°. Gasraum Sauerstoff

Zeit Min.	10 ccm 2proz Fructose in m/1 Phosphat 8 sekundär, 2 primar p_H etwa 7,4 cmm O_2	10 ccm 2proz Fructose in Glykokoll-Natronlauge 6 Glykokoll, 4 NaOH p_H etwa 10,1 cmm O_2	10 ccm 2proz Fructose in Glykokoll-Natronlauge 5 Glykokoll, 5 NaOH p_H etwa 11,3 cmm O_2
30	70	12,4	56
60	158	29,4	118
90	266	49,5	176

Phosphatlosung ist die Oxydationsgeschwindigkeit am größten, die Phosphatlosung wirkt auf Fructose starker ein als eine n/1000 Natronlauge.

In anderen Versuchen wurde die Konzentration an Phosphat (und an Fructose) konstant gehalten und nur die Konzentration der Wasser-

Tabelle 3. 38°. Gasraum Sauerstoff

Zeit Min.	5 ccm 6proz Fructoselosung in m/1 Phosphat 2 sekund, 8 prim p_H etwa 6,2 cmm O_2	5 ccm 6proz Fructoselosung in m/1 Phosphat 5 sekund., 5 prim p_H etwa 6,8 cmm O_2	5 ccm 6proz Fructoselosung in m/1 Phosphat 8 sekund, 2 prim p_H etwa 7,4 cmm O_2	5 ccm 6proz Fructoselosung in m/1 Phosphat 9,5 sekund, 0,5 prim p_H etwa 8,0 cmm O_2
30	16	41	106	178
60	28	89	237	392

stoffionen variiert (Tabelle 3 und Abb. 1). Man erkennt, daß die Wirkung des Phosphats bei schwach saurer Reaktion beginnt und mit steigender Alkalitat der Losungen zunimmt

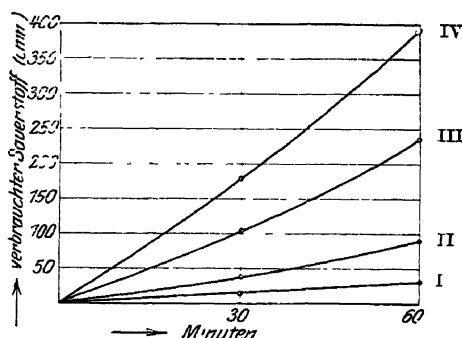



Abb 1. 5 ccm 6proz Fructose in 1/1 molarem Phosphat Kurve I p_H etwa 6,2 Kurve II p_H etwa 6,8 Kurve III p_H etwa 7,4 Kurve IV p_H etwa 8,0

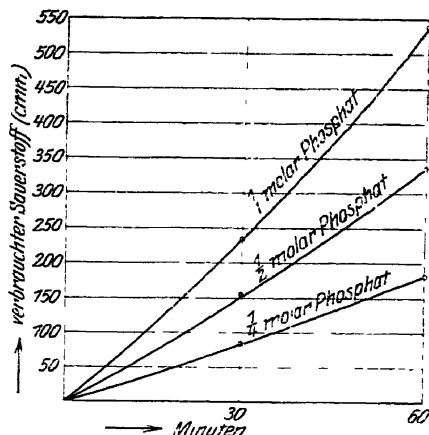



Abb 2. 10 ccm 6proz Fructose in 8,5 sek 1,5 prim Phosphat

IV. Einfluß der Phosphatkonzentration.

Halt man die Konzentration der Wasserstoffionen und der Fructose konstant und variiert die Konzentration des Phosphats, so steigt die Geschwindigkeit der Oxydation, und zwar etwas langsamer als die Phosphatkonzentration (Abb 2, Tabelle 4)

Tabelle 4. 38° Gasraum Sauerstoff

Zeit Min.	10 ccm 6proz Fructoselosung in m/1 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär cmm O_2	10 ccm 6proz Fructoselosung in m/2 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär cmm O_2	10 ccm 6proz Fructoselosung in m/4 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primär cmm O_2
30	235	152	84
60	537	335	181

Daß es sich hier um eine spezifische Wirkung der Phosphate handelt, geht daraus hervor, daß Phosphat durch andere Salze nicht ersetzt werden kann. Lost man Fructose in verdunntem Phosphat und stellt den hohen Salzgehalt durch andere Salze her, so beobachtet man — soweit unsere Erfahrungen reichen — entweder keine Wirkung auf die Oxydationsgeschwindigkeit oder eine Hemmung der langsamen, in

Tabelle 5 38 ° Gasraum Sauerstoff.

Zeit Min	10 ccm 2proz Fructoselosung in m/10 Phosphat 9 sekund 1 prim — cmm O_2	10 ccm 2proz Fructoselosung in m/10 Phosphat 9 sekund, 1 prim 25proz Li_2SO_4 cmm O_2	10 ccm 2proz Fructoselosung in m/10 Phosphat 9 sekund, 1 prim 25proz Na_2SO_4 cmm O_2	10 ccm 2proz Fructoselosung in m/10 Phosphat 9 sekund, 1 prim 25proz NaCl cmm O_2
60	19	0	—	—
120	48	0	39	21
180	77	0	67	35

dem verdunnten Phosphat vor sich gehenden Oxydation (Tabelle 5) Lithiumsulfat bringt die von dem verdunnten Phosphat herruhrende Wirkung sogar vollstandig zum Verschwinden

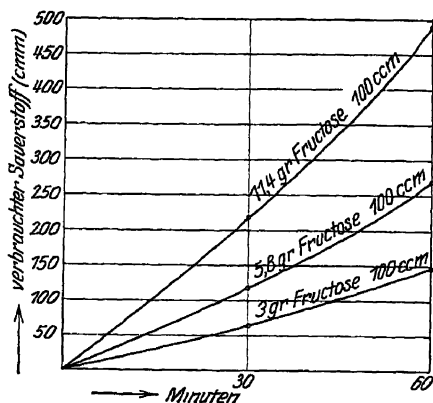



Abb 3 5 ccm Fructoselosung in $^1/_1$ molarem Phosphat (8,5 Sek, 1,5 prim)

V. Einfluß der Fructosekonzentration.

Halt man die Konzentration der Wasserstoffionen und die Konzentration des Phosphats konstant und variiert die Konzentration der Fructose, so steigt die Geschwindigkeit der Oxydation etwa proportional der Fructosekonzentration (Abb 3 und Tabelle 6)

Tabelle 6. 38 ° Gasraum Sauerstoff

Zeit Min	5 ccm Fructoselosung 3 g 100 ccm in m/1 Phosphat 8,5 sekundar, 1,5 primär cmm O_2	5 ccm Fructoselosung 5,8 g 100 ccm in m/1 Phosphat 8,5 sekundär, 1,5 primar cmm O_2	5 ccm Fructoselosung 11,4 g 100 ccm in m/1 Phosphat 3,5 sekundar, 1,5 primar cmm O_2
30	65	120	220
60	148	270	487

VI. Messung der bei der Oxydation gebildeten Kohlensäure.

Unter allen von uns gepruften Bedingungen entsteht bei der Oxydation der Fructose in Phosphat Kohlensaure, und zwar — unabhängig von der Konzentration der Wasserstoffionen und der Konzentration

der Fructose — immer etwa 0.3 Mol Kohlensaure auf 1 Mol absorbierten Sauerstoffs. Beispiele enthalt Tabelle 7, in die sowohl die beobachteten Drucke, als auch die daraus berechneten Kohlensaurewerte eingetragen sind.

Zur Erlauterung der Tabelle ist folgendes zu bemerken Ein Teil der gebildeten Kohlensaure wird während des Oxydationsversuchs an den Gasraum des Atmungstroges abgegeben der Rest wird von der Losung als Bicarbonat gebunden und erscheint erst beim Ansauern mit Schwefelsaure am Ende des Oxydationsversuchs Je alkalischer die Losung ist um so mehr Kohlensaure wird chemisch gebunden um so weniger Kohlensaure wahrend des Oxydationsversuchs an den Gasraum des Atmungstroges abgegeben Die alkalischen Losungen entwickeln dementsprechend (Versuche 1 und 4) erst beim Ansauern die Hauptmenge der Kohlensaure, die sauren Lösungen (Versuch 3) schon vor dem Ansauern

Tabelle 7 38° Gasraum Sauerstoff

Nr	Zusammensetzung der Fructoselosung	Trog I Hauptraum 2 ccm Fructoselosung Einsatz 1 ccm 5proz Kalilauge v_F 3 ccm, v_G = 26 ccm, K_{O_2} 2,3	Trog II Hauptraum 2 ccm Fructoselosung Einsatz 1,5 ccm 3 f n Schwefelsaure v_F = 3,5 ccm, v_G = 25,5 ccm, K_{O_2} 2,25, K_{CO_2} = 2,44	Trog III. Hauptraum 2 ccm Fructoselosung. Einsatz: 1,5 ccm 3 f n Schwefelsäure v_F = 3,5 ccm, v_G = 26,5 ccm, K_{CO_2} = 2,53	$\frac{CO_2}{O_2}$
1	6 g Fructose, 100 ccm m/1 sekundares Phosphat p_H undefiniert	Nach 210 Min 418 mm O_2 940 cmm	Nach 210 Min — 397 mm CO_2 = + 60 cmm Nach Einkippen d Schwefelsaure + 102 mm = + 249 cmm CO_2	Nach Einkippen d Schwefelsaure zur Zeit t^0 + 8 mm = + 23 cmm CO_2	$\frac{60 + 249 - 23}{940} = 0,31$
2	12 g Fructose, 80 ccm sekundares, 20 ccm primares m/1 Phosphat p_H etwa 7,4	Nach 160 Min 234 mm O_2 539 cmm	Nach 160 Min — 192 mm CO_2 + 113 cmm Nach Einkippen d Schwefelsaure + 25 mm + 61 cmm CO_2	Nach Einkippen d Schwefelsaure zur Zeit t^0 + 3 mm + 7,6 cmm CO_2	$\frac{113 + 61 - 8}{539} = 0,31$
3	12 g Fructose, 50 ccm sekundares, 50 ccm primares m/1 Phosphat p_H etwa 6,8	Nach 360 Min 374 mm O_2 630 cmm	Nach 360 Min — 214 mm CO_2 + 159 cmm Nach Einkippen d Schwefelsaure + 9 mm + 22 cmm CO_2	Nach Einkippen d Schwefelsaure zur Zeit t^0 0	$\frac{159 + 22}{630}$ 0,29
4	5 g Fructose, 95 ccm sekundares, 5 ccm primares m/1 Phosphat p_H etwa 8,0	Nach 300 Min 380 mm O_2 870 cmm	Nach 300 Min — 130 mm CO_2 + 145 cmm Nach Einkippen d Schwefelsaure + 85 mm = 208 cmm CO_2	Nach Einkippen d Schwefelsaure zur Zeit t^0 + 21 mm = + 53 cmm CO_2	$\frac{145 + 208 - 53}{870} = 0,35$

Die Berechnung geschieht nach den in dieser Zeitschrift Band 113, S. 282 gegebenen Formeln. Bezeichnen wir mit h^{I} und h^{II} die beim Oxydationsversuch in den Trögen I und II beobachteten Druckänderungen, mit $K^{I}_{O_2}$, $K^{I}_{CO_2}$ und $K^{II}_{O_2}$, $K^{II}_{CO_2}$ die zu den Trögen I und II gehörenden Gefäßkonstanten, mit x_{O_2} den Sauerstoffverbrauch, mit x_{OC_2} die an den Gasraum während des Oxydationsversuchs abgegebene Kohlensäure, so sind die verschwundenen und entstandenen Gasmengen in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = h^{I} K^{I}_{O_2} \qquad x_{CO_2} = h^{II} K_{CO_2} - x_{O_2} \frac{K^{II}_{CO_2}}{K^{II}_{O_2}}.$$

Sind ferner H^{II} und H^{III} die Drucke, die beim Ansäuern der Lösungen entstehen, so sind die chemisch gebundenen Kohlensäuremengen in Kubikmillimetern zu Beginn des Oxydationsversuchs: $H^{III} K^{III}_{CO_2}$, am Ende des Oxydationsversuchs: $H^{II} K^{II}_{CO_2}$, und die durch Oxydation der Fructose gebildete Kohlensäuremenge ist

$$x_{CO_2} + H^{II} K^{II}_{CO_2} - H^{III} K^{III}_{CO_2}.$$

Biochem. Zeitschr. 165, 196 1925.

Über die Wirkung der Blausäure auf die alkoholische Gärung.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7. September 1925.)

Mit 4 Abbildungen.

E. BUCHNER, H BUCHNER und M. HAHN fanden[1], daß Blausaure in 0.44 mol. Konzentration die Vergarung von Zucker durch Hefepreßsaft hemmt. Ich habe mich gefragt, ob die Blausaure hier, wie die Narkotica[2]. unspezifisch auf die Preßsaftkolloide wirkt oder ob eine chemische Reaktion vorliegt

Zur Beantwortung dieser Frage vergleichen wir die Adsorption und die Wirkung der Blausaure mit der Adsorption und der Wirkung eines Narkoticums. und wahlen als Vergleichsnarkoticum Acetonitril, das zu den schwachsten Narkotica gehort

Zunachst vergleichen wir die Adsorption von Blausaure und Acetonitril Bezeichnen wir mit a die adsorbierten Mengen mit c die Konzentrationen in der Losung die mit a im Gleichgewicht sind so ist fur Merck'sche Blutkohle[3]:

	c Mole Liter Losung	a Mikromole g Kohle
Acetonitril	0,17	1500
Blausaure	0,17	790

Bei gleichem c ist a fur Acetonitril großer als fur Blausaure Acetonitril wird starker adsorbiert als Blausaure

Weiterhin vergleichen wir die Wirkung von Blausaure und Acetonitril auf Hefepreßsaft Um durch Acetonitril eine starke Garungs-

---

[1] BUCHNER, E , H BUCHNER u M. HAHN Die Zymasegarung. S 181 München 1903.

[2] WARBURG, O. u. R. WIESEL: Pflugers Arch f. d. ges. Physiol. 144, 465. 1912.

[3] Näheres uber die Adsorption der Narkotica und der Blausaure diese Zeitschrift 119, 134. 1921. Nach den dort mitgeteilten Zahlen habe ich die Adsorptionskurve der Blausäure gezeichnet, die man in Abschnitt V dieser Arbeit findet.

hemmung zu erzielen[1], mussen wir 80 g oder 2 Mole des Narkoticums in einem Liter Preßsaft auflösen Um durch Blausaure eine starke Garungshemmung zu erzielen, mussen wir nach BUCHNER und HAHN 12 g oder 0,44 Mole Blausaure in einem Liter Preßsaft auflosen. Blausaure wirkt also auf die Preßsaftgarung starker als Acetonitril, obwohl sie schwacher adsorbiert wird

Da fur Narkotica ausnahmslos die Regel gilt, daß sie um so stärker wirken, je starker sie adsorbiert werden, so folgt aus den angefuhrten Zahlen mit großer Wahrscheinlichkeit, daß Blausaure auf die Garung spezifisch-chemisch wirkt Immerhin aber liegt der von BUCHNER und HAHN angegebene Blausaurewert von 0,44 Molen so nahe an dem Acetonitrilwert, daß es wunschenswert erschien, die Blausaurekonzentration, bei der eine Garungshemmung auftritt, genauer zu bestimmen Dies geschah in den Versuchen, die im folgenden beschrieben werden

I. Das Versuchsmaterial

war sowohl lebende Hefe als auch Hefesaft nach A v LEBEDEW

Die lebende Hefe war obergarige Hefe (Rasse M des Berliner Instituts für Garungsgewerbe) 2 g abgepreßte Hefe wurden zweimal mit 100 ccm 0,2 mol KH_2PO_4-Losung auf der Zentrifuge gewaschen und dann mit der gleichen Lösung auf ein Volumen von 100 ccm gebracht Je 1 ccm dieser Suspension wurde für einen Versuch benutzt

Der Hefesaft wurde aus Unterhefe des Berliner Instituts fur Garungsgewerbe nach der Vorschrift[2] von A. v. LEBEDEW gewonnen Die mit Wasser gewaschene und auf der Nutsche abgesaugte Hefe wurde im Faust-Hein-Apparat bei 35° getrocknet 1 Gewichtsteil Trockenhefe mit 3 Gewichtsteilen Wasser verrieben, wurde 2 Stunden bei 35° gehalten Dann wurde scharf zentrifugiert und der uberstehende hellbraune Saft von dem Sediment abgehoben Der Saft enthielt 11% Trockensubstanz und zeigte nur geringe Selbstgarung Er enthielt uberschussiges freies Phosphat (Zugabe von freiem Phosphat bewirkte keine Zunahme der Gärgeschwindigkeit)

Wurde die Trockenhefe vor Zusatz des Wassers fein zerrieben, so ließ sich der Saft durch Zentrifugieren nicht klären. Die beim Zentrifugieren erhaltene überstehende Flussigkeit sah weißlich aus (Glykogenkornchen?) und zeigte starke Selbstgarung[3] Da starke Selbstgarung die Versuche kompliziert, wurde solcher Saft nicht verwendet

---

[1] Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465. 1912

[2] LEBEDEW, A. v. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 447. 1911.

[3] Dasselbe hat O. MEYERHOF beobachtet. Vgl O. MEYERHOF, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 101, 165 1918.

II. Die Gärungsmessung

geschah manometrisch, in Gefaßen nach Abb 1, deren Volumen etwa 20 ccm war. In den Hauptraum wurde 1 ccm Hefesuspension oder 1 ccm Lebedew-Saft gegeben, in die Ansatzbirne 0,2 ccm einer 25 proz. Glucoselösung. Der Gasraum wurde mit 5 Vol -Proz Kohlensaure in Stickstoff oder mit Stickstoff gefüllt. Die Versuchstemperatur war 19—20°. Nach erfolgtem Temperatur- und Druckausgleich wurde zunächst die Selbstgärung beobachtet, die klein war, und dann der Zucker aus der Birne in den Hauptraum durch mehrmaliges Neigen des Gefäßes herübergespült. Bei dieser Anordnung entging, von der Zeit des Zuckerzusatzes an, keine Minute der Beobachtung.

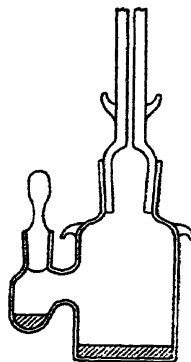



Abb. 1

Betrug die Zunahme des Kohlensauredruckes h_{CO_2} mm Brodie (10000 mm Brodie = 760 mm Hg), so war die gebildete Garungskohlensäure in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} \cdot k_{CO_2},$$

wo k_{CO_2} die Gefaßkonstante fur Kohlensaure bedeutet

Da bei der sauren Reaktion der Versuchsflüssigkeiten Kohlensaure nicht retiniert wurde, so war k_{CO_2} nach der einfachen Formel

$$k_{CO_2} = \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}}{10000}$$

zu berechnen (v_G Volumen des Gasraumes, v_F Volumen der Flussigkeit beide in Kubikmillimetern, T absolute Versuchtemperatur α_{CO_2} Bunsenscher Absorptionskoeffizient fur Kohlensaure bei T^0 $\alpha^{20^\circ}_{CO_2}$ wurde gleich 0 84 gesetzt)

Fur die beschriebenen Versuchsbedingungen wird k_{CO_2} etwa gleich 2 Stieg also der Kohlensauredruck um 1 mm Brodie, so waren etwa 2 cmm Garungskohlensaure gebildet

III. Die Wirkung der Blausäure auf den Lebedew-Saft

zeigt Abb 2, in der die gebildete Garungskohlensaure x als Funktion der Zeit t dargestellt ist t ist von der Zeit des Zuckerzusatzes an gerechnet Die Blausaure ist im Falle der Kurven II und III 60 Minuten vor dem Zucker, im Falle der Kurve IIIa 30 Minuten nach dem Zucker zugefugt worden Die vier Kurven sind gleichzeitig aufgenommen fur je 1 ccm eines und desselben Saftes $\frac{dx}{dt}$ ist die Gargeschwindigkeit. Sie steigt mit der Zeit an, sowohl in dem blausaurefreien, als auch in dem blausaurehaltigen Saft. n/1000 Blausäure übt nur eine geringe gärungshemmende Wirkung aus, wie ein Vergleich der Kurven I und II

lehrt n/100 Blausäure hemmt, und zwar stärker, wenn sie einige Zeit vor der Glucose, als wenn sie einige Zeit nach der Glucose zugesetzt worden ist. Dies erkennt man, wenn man die Kurven III und IIIa mit der Kurve I vergleicht.

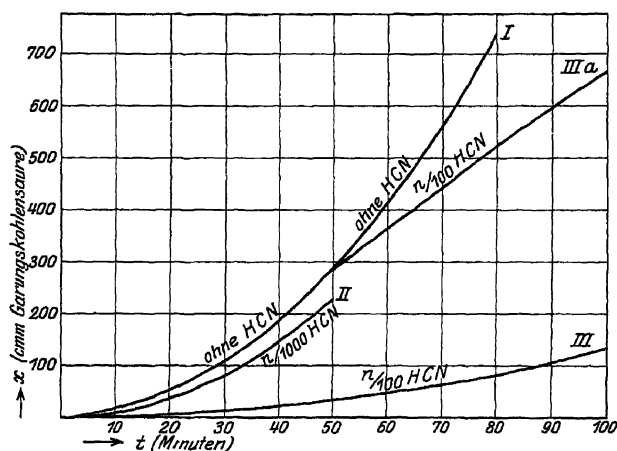



Abb. 2. 1 ccm Lebedew-Saft, 4 Proz. Glucose, Gasraum 5 Vol.-Proz. Kohlensäure in Stickstoff. Versuchstemperatur 20°.

Die Gargeschwindigkeit steigt längs der Kurven I und III in gleichem Verhältnis an. Beispielsweise steigt sie im Laufe von 70 Minuten auf der Kurve I von 1,7 auf 17,6, auf der Kurve III von 0,2 auf 2,0, in beiden Fällen also auf das 10fache. Deshalb ist es gleichgültig, welches Zeitelement man zur Berechnung der Gärungshemmung wählt. Während der ganzen Dauer des Versuches hemmt n/100 Blausäure die Gargeschwindigkeit um rund 90%.

Dieselbe Blausäurekonzentration hemmt, wenn man die Blausäure 50 Minuten nach der Glucose zusetzt, zunächst 40%; die Hemmung wird dann im Laufe der Zeit größer (IIIa).

In jedem Falle wird die Gargeschwindigkeit durch n/100 Blausäure gehemmt, während, wie in der Einleitung erwähnt, eine narkotische Wirkung der Blausäure erst bei Konzentrationen von über 2,0 n zu erwarten ist. Blausäure wirkt also, wie wir jetzt sagen können, rund 200mal stärker, als ihrer Adsorptionskonstanten entspricht.

IV. Die Wirkung der Blausäure auf lebende Hefe.

Wäre die Wirkung der Blausäure eine narkotische, so müßte sie in lebender Hefe, wo die Fermente an die Struktur gebunden sind, nach den vorliegenden Erfahrungen[1] größer sein als in Hefesaft.

In Abb. 3 ist die Gärungskohlensäure, die lebende Hefe bei verschiedenen Blausäurekonzentrationen entwickelt, als Funktion der Zeit t dargestellt. t ist wieder von der Zeit des Zuckerzusatzes an gerechnet. Die Blausäure ist im Falle der Kurven II und III 60 Minuten vor dem Zucker, im Falle der Kurve IIIa 40 Minuten nach dem Zucker zugefügt worden.

[1] Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 99. 1912; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 158, 19. 1914.

Das Bild der Kurven ist in wesentlichen Punkten dasselbe wie für den Lebedew-Saft n/1000 Blausäure übt, abgesehen von den ersten 10 Minuten, nur eine geringe gärungshemmende Wirkung aus n/100 Blausäure, vor dem Zucker zugesetzt, hemmt die Gärgeschwindigkeit zunächst um 90% Die Hemmung nimmt dann mit der Zeit ab und beträgt im weiteren Verlauf rund 50%. n/100 Blausäure einige Zeit nach dem Zucker zugesetzt, hemmt die Gärgeschwindigkeit um 50%

Das Resultat ist, daß n/100 Blausäure in jedem Falle die Gärgeschwindigkeit in lebender Hefe stark hemmt, wobei die Hemmungen nie größer sind als in Hefesaft Auch dieses Resultat schließt aus, daß die beobachteten Blausäurewirkungen narkotische sind

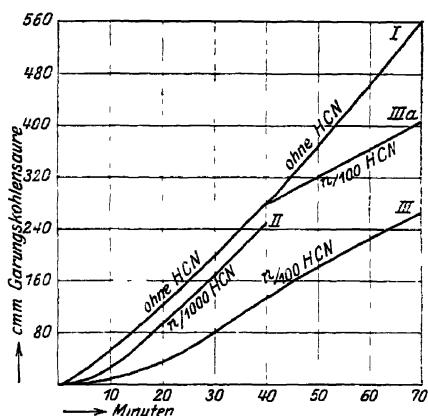



Abb 3. 4 mg lebende Hefe (Trockengewicht) in 1 ccm 0,2 mol KH_2PO_4, 4 Proz. Glucose. Gasraum Stickstoff. Versuchstemperatur 19°.

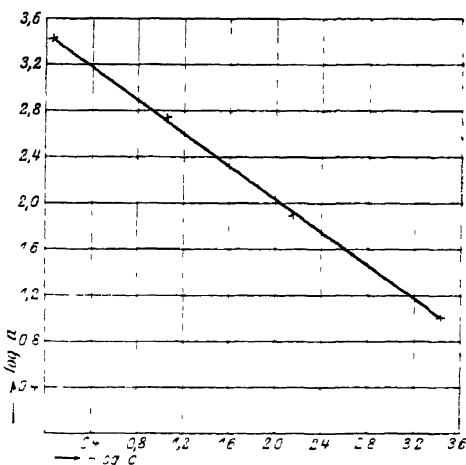



Abb 4. Adsorption der Blausäure an Merckscher Blutkohle. c = Konzentration der Blausäure in der Lösung in Mole/Liter, a = adsorbierte Blausäure in Mikromole/Gramm Kohle.

V. Protokolle

1. Adsorption der Blausäure an Blutkohle

Die beobachteten a- und c-Werte sind[1]

c Mole/Liter Lösung	a Mikromole/g Kohle
$3{,}8 \cdot 10^{-4}$	10
$70 \cdot 10^{-4}$	80
$890 \cdot 10^{-4}$	550
$8800 \cdot 10^{-4}$	2600

In Abb 4 ist log a als Funktion von — log c dargestellt Die erhaltene Kurve ist nahezu eine gerade Linie die a—c-Kurve also eine Freundlichsche Adsorptionsisotherme[2]

[1] Nach dieser Zeitschr **119**, 161. 1921

[2] Freundlich, H : Zeitschr f. physik. Chem. **57**, 385 1906.

2. Protokoll zu Abb. 2.
Lebedew-Saft bei 20° in 5proz. CO_2-N_2.

Zeit Min	1 ccm Saft ohne HCN cmm CO_2		1 ccm Saft n/1000 HCN cmm CO_2	1 ccm Saft n/100 HCN cmm O_2
	Selbstgärung vor Zugabe der Glucose.			
20	16		11	3,9
40	26		22	7,8
	Gärung nach Zugabe von 50 mg Glucose.			
10	17		11	2
20	51		36	6
30	106		80	14
40	182		142	20
50	285		230	33
	ohne HCN	n/100 HCN		
70	564	445	—	61
80	740	525	—	81
90	—	595	—	104
100	—	665	—	130
	Kurve I	Kurve IIIa	Kurve II	Kurve III

3. Protokoll zu Abb. 3.
Lebende Hefe in 0,2 mol. KH_2PO_4 bei 19° Stickstoff.

Zeit Min.	4 g Hefe[1] in 1 ccm Phosphatlösung			
	ohne HCN cmm CO_2	ohne HCN cmm CO_2	n/1000 HCN cmm CO_2	n/100 HCN cmm CO_2
5	20	21	6	2
10	53	51	26	8
15	88	86	57	18
20	124	122	95	34
25	160	158	132	55
30	196	194	170	80
40	280	269[2]	250	134
50	370	320	330	180
60	460	366	410	223
70	560	405	490	264
	Kurve I	Kurve IIIa	Kurve II	Kurve III

[1] Trockengewicht
[2] Nach 40 Min soviel HCN hinzugefügt, daß in bezug auf HCN n/100

Biochem. Zeitschr. 165, 203. 1925.

Über die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf chemische Vorgänge in Zellen.

Von

Erwin Negelein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. September 1925.)

Mit 1 Abbildung.

I. Historisches über die Wirkung des Schwefelwasserstoffs.

In seinem Handbuche der Chemie[1] zitiert J. J. BERZELIUS die folgenden Versuche von THÉNARD. „D'après THÉNARD, un oiseau, par exemple un pinson. meurt sur le champ dans l'air qui ne contient q'un quinze centième de son volume de sulfide hydrique, il ne faut q'un huit centième de volume de l'air de sulfide hydrique, pour faire périr un chien et un deux cent cinquantième pour tuer un cheval".

Nach diesen Angaben können wir die Schwefelwasserstoffkonzentration im Blutplasma die tödlich wirkt, angenähert berechnen.

In dem ersten von THÉNARD erwähnten Fall ist der Schwefelwasserstoff-Partialdruck bei normalem Atmosphärendruck

$$\frac{760}{1500} = 0{,}51 \text{ mm Hg}$$

und folglich die Schwefelwasserstoffkonzentration c im Blutplasma in Molen/Liter

$$c = \frac{0{,}51}{760} \cdot \alpha \cdot \frac{1000}{22400},$$

wo α den Bunsenschen Absorptionskoeffizienten des Schwefelwasserstoffs (für Plasma und Bluttemperatur) bedeutet.

Setzen wir $\alpha = 1{,}66$, so wird

$$c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ Mole/Liter.}$$

Bei der Berechnung wird vorausgesetzt, daß in THÉNARDS Versuchen das Plasma mit dem angewandten Schwefelwasserstoffdruck im Gleichgewicht war. Trifft diese Voraussetzung nicht zu, so ist die tödlich wirkende Schwefelwasserstoffkonzentration kleiner als $5 \cdot 10^{-5}$ Mole/Liter.

---

[1] BERZELIUS, J. J.: Traité de Chimie 7, 108. Paris 1833.

Spater hat sich C F Schönbein[1] mit der giftigen Wirkung des Schwefelwasserstoffs beschaftigt Er fand, daß die wasserstoffperoxydspaltende Wirkung „organischer Materie" durch kleine Mengen Schwefelwasserstoff aufgehoben wird, und fugte die Bemerkung hinzu, daß damit immer der Verlust anderer Fermentwirkungen verbunden sei, beispielsweise der Verlust der Garwirkung

Was die Erklarung der Giftwirkung anbetrifft, so dachte man zeitweise an eine Reaktion mit dem Blutfarbstoff (Hoppe-Seylers Sulfhämoglobin[2], wie man auch zeitweise versuchte, die Blausäurewirkung auf eine Reaktion mit dem Blutfarbstoff zuruckzufuhren (Hoppe-Seylers Cyanhamoglobin[2]

Hierbei ubersah man, daß Schwefelwasserstoff und Blausaure allgemeine Zellgifte sind, im Gegensatz zu dem Kohlenoxyd, das ein spezielles Blutgift ist und nur auf blutfuhrende Organismen giftig wirkt Falls die Hoppe-Seylersschen Reaktionen bei der Vergiftung hoherer Tiere mit Blausäure oder Schwefelwasserstoff eine Rolle spielen, so sind sie Entgiftungsreaktionen, die die Giftkonzentrationen im Plasma vermindern.

II. Methodik.

Die Messung der Stoffwechselvorgange geschah manometrisch In keinem Falle durfte der Einsatz der Versuchsgefaße Kalilauge enthalten — wegen der Absorption des Schwefelwasserstoffes durch Laugen —, vielmehr waren die Methoden anzuwenden[3], die auf der verschiedenen Loslichkeit der Kohlensaure und des Sauerstoffs beruhen Die spezielle Anordnung war von Fall zu Fall verschieden und wird in den einzelnen Abschnitten beschrieben Die Sperrflussigkeit der Barcroftmanometer war Brodiesche Flussigkeit, von der 10000 mm = 760 mm Hg Alle Druckanderungen sind in Millimetern Brodiescher Flussigkeit gemessen und angegeben.

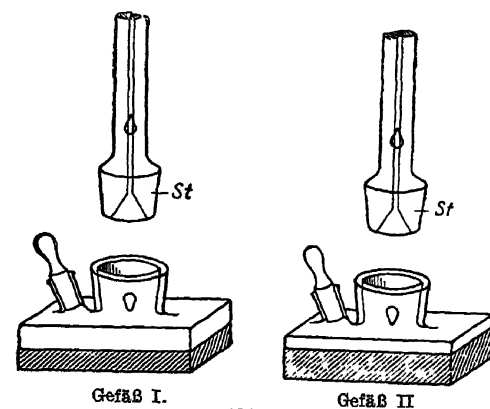



Abb 1

Einer Erlauterung bedarf das Verfahren, nach dem bestimmte Kon-

[1] Schonbein, C. F. Journ prakt. Chem. (1) 89, 323 1863
[2] Hoppe-Seyler: Med. Chem. Unters. Berlin 1866 bis 1871.
[3] Diese Zeitschr. 152, 51. 1924

zentrationen an Schwefelwasserstoff in den Versuchsflüssigkeiten hergestellt wurden. Die Versuchsflüssigkeiten waren saure Phosphat-(KH_2PO_4) Lösungen oder — wenn die Nitratassimilation gemessen wurde — salpetersaure Lösungen. Sie wurden in die Versuchsgefäße (Abb. 1) eingefüllt und mit Gasmischungen, die bei den verschiedenen Versuchen verschieden waren, gesättigt. War dies geschehen, so wurde die gewünschte Schwefelwasserstoffkonzentration durch Zugabe von Natriumsulfid (Na_2S) erzeugt, dessen Menge immer klein war gegen die Menge an KH_2PO_4 oder HNO_3, so daß sich das zugefügte Natriumsulfid praktisch vollständig in freien Schwefelwasserstoff und Nitrat oder Phosphat umsetzte.

Da die Versuchsflüssigkeit mit einem Gasraum in Verbindung stand, so entwich Schwefelwasserstoff in den Gasraum. Da der Gasraum abgeschlossen war, so stellte sich ein Gleichgewicht ein, und zwar war im Gleichgewicht das Verhältnis

$$\frac{H_2S \text{ im Gasraum} + H_2S \text{ gelöst}}{H_2S \text{ gelöst}} = \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{v_F \alpha}, \qquad (1)$$

wo v_G und v_F die Volumina des Gas- und Flüssigkeitsraums sind, T die (abs.) Temperatur und α der Bunsensche Absorptionskoeffizient für Schwefelwasserstoff (für die Versuchsflüssigkeit und die Versuchstemperatur). α^{20° setzte ich gleich 2.55.

Aus (1) ergibt sich die Zahl n der Mole Na_2S, die wir in das Versuchsgefäß hineinbringen müssen, um in der Lösung die H_2S-Konzentration von c-Molen/Liter zu erzeugen. Es ist

$$n = c \cdot 10^{-3} \cdot v_F \cdot \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{v_F \alpha}$$

$$n = c \cdot 10^{-3} \cdot \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{\alpha} \qquad (2)$$

III. Die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Atmung und Gärung in Hefezellen.

Zur Messung des Stoffwechsels der Hefe dienten Gefäße von der Form der Abb. 1, und zwar zwei Gefäße zur Messung des Stoffwechsels unter aeroben Bedingungen und ein Gefäß zur Messung des Stoffwechsels unter anaeroben Bedingungen.

Was den ersten Fall anbetrifft, so kann man entweder mit gleichen Zellmengen oder mit gleichen Zellkonzentrationen arbeiten. Ich habe im allgemeinen mit gleichen Zellmengen gearbeitet.

Betrugen die Druckänderungen, die unter aeroben Bedingungen gleiche Zellmengen in gleichen Zeiten hervorbrachten, H mm (Gefäß I mit den Konstanten K_{O_2} und K_{CO_2}) und h mm (Gefäß II mit den Konstanten k_{O_2} und k_{CO_2}), so war der verbrauchte Sauerstoff x_{O_2} in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = \frac{h k_{CO_2} - H K_{CO_2}}{\frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}} - \frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}}} \tag{3}$$

und die gebildete Kohlensäure x_{CO_2} in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = \frac{h k_{O_2} - H K_{O_2}}{\frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}} - \frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}}}, \tag{4}$$

x_{CO_2} war die Summe von Atmungskohlensäure und Gärungskohlensäure. Nahm man an, daß ebensoviel Atmungskohlensäure gebildet, als Sauerstoff verbraucht wurde, so war die aerob gebildete Gärungskohlensäure x_G in Kubikmillimetern

$$x_G = x_{CO_2} + x_{O_2}$$

Betrug die Druckänderung, die unter anaeroben Bedingungen beobachtet wurde, h_{CO_2} mm, so war die gebildete Kohlensäure in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = h_{CO_2} k_{CO_2} \tag{5}$$

In diesem Falle war x_{CO_2} gleich der gebildeten Gärungskohlensäure x_G.

Tabelle 1 enthält 2 Versuchsbeispiele. In Versuch 1 ist der aerobe und der anaerobe Stoffwechsel ohne Schwefelwasserstoff gemessen worden, in Versuch 2 der aerobe Stoffwechsel bei einer Schwefelwasserstoffkonzentration von 10^{-4} Molen/Liter, der anaerobe Stoffwechsel wieder ohne Schwefelwasserstoff. Das Ergebnis ist, daß 10^{-4} molar Schwefelwasserstoff die Atmung gärender Hefe vollkommen hemmt, und daß gleichzeitig die Gärung von dem aeroben auf den anaeroben Wert steigt. 10^{-4} molar Schwefelwasserstoff — in Sauerstoff — stellt also die Bedingungen der Anaerobiose her und wirkt offenbar auf die Gärung nur insofern, als er die Atmung hemmt.

Mit der gleichen Versuchsanordnung fand ich, daß noch 10^{-5} n Schwefelwasserstoff die Hefeatmung vollkommen hemmt, während 10^{-6} n-Schwefelwasserstoff ohne deutliche Wirkung ist.

Wegen des Einflusses der Atmung auf die Gärung kann die direkte Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf die Gärung nur durch die Versuche unter anaeroben Bedingungen ermittelt werden. Stellt man solche Versuche unter Zusatz von Schwefelwasserstoff an, so zeigt sich, daß 10^{-4} molar Schwefelwasserstoff auf die Gärung nicht wirkt. Noch die 5fache Konzentration an Schwefelwasserstoff ist ohne Einfluß auf

Tabelle 1. *Wirkung von Schwefelwasserstoff auf Hefe unter aeroben Bedingungen.*

Obergärige Hefe[1] in 0,5 molarer KH_2PO_4-Lösung. 1% Glucose. 20°. In jedem Gefäß 1,4 mg Hefe (Trockengewicht).

Nr.	Gasraum	H_2S-Konzentration	Gefäß-volumina		Gefäß-konstanten		Beobachtete Druckänderungen	Sauerstoffverbrauch (x_{O_2})	Gesamtkohlensäure (x_{CO_2})	Gärungskohlensäure (x_G)	
			v_F	v_G	für O_2	für CO_2					
		Mole/Lit.	ccm	ccm			mm	cmm	cmm	cmm	
1	Luft . . .	—	3,0	9,28	$k_{O_2} = 0,87$	$k_{CO_2} = 1,12$	$h = +32$ in 60′	—50	+ 100	+ 50 (aerob)	
			8,0	5,64	$K_{O_2} = 0,55$	$K_{CO_2} = 1,22$	$H = -9$ in 60′				
	Stickstoff .		3,0	10,5	—	$k_{CO_2} = 1,24$	$h_{CO_2} = +146$ in 60′	—	+ 182	+ 182 (anaerob)	
2	Luft	10^{-4}	3,0	9,28	$k_{O_2} = 0,87$	$k_{CO_2} = 1,12$	$h = +145$ in 45′	0	+ 174	+ 174 (aerob)	Hemmung der Atmung 100 %. Keine Hemmung der Gärung, sondern Anstieg der Gärung auf den anaeroben Wert
			8,0	5,64	$K_{O_2} = 0,55$	$K_{CO_2} = 1,22$	$H = +152$ in 45′				
	Stickstoff .	—	3,0	10,5	—	$k_{CO_4} = 1,24$	$h_{CO_2} = +132$ in 45′	—	+ 164	+ 164 (anaerob)	

[1] Rasse M des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe.

die Gärung, und erst bei 60facher Konzentration finden wir eine starke Wirkung auf die Gärung (Tabelle 2). Infolge dieser großen Spanne zwischen atmungs- und gärungshemmender Konzentration (10^{-5} n gegenüber $6 \cdot 10^{-3}$ n) ist es möglich, mit Hilfe von Schwefelwasserstoff die Atmung der Hefe von ihrer Gärwirkung vollkommen zu trennen.

Tabelle 2. *Wirkung von Schwefelwasserstoff auf Hefe unter anaeroben Bedingungen.* Obergärige Hefe (Rasse M) in 0,5 molarer KH_2PO_4-Lösung. 1 Proz. Glucose. 20°. In jedem Gefäß 4 mg Hefe (Trockengewicht).

Gasraum	H_2S-Konzentration Mole/Liter	Gefäßvolumina v_F ccm	Gefäßvolumina v_G ccm	Gefäßkonstante für Kohlensäure k_{CO_2}	Beobachtete Druckänderungen mm	Gärungskohlensäure (x_G) cmm	Hemmung der Gärung %
Stickstoff	—	10	18,8	2,52	h_{CO_2} = + 112 in 45′	282	—
Stickstoff .	$5{,}4 \cdot 10^{-4}$	10	23,7	2,95	h_{CO_2} = + 95 in 45′	281	0
Stickstoff .	$5{,}8 \cdot 10^{-3}$	10	20,0	2,62	h_{CO_2} = + 21,5 in 45′	57	80

IIIa. Die Wirkung von Blausäure auf die Atmung in Hefezellen.

An dieser Stelle seien Versuche über die Wirkung der Blausäure auf die Atmung gärender Hefe eingeschaltet, der einzige von den fünf untersuchten Stoffwechselvorgängen, für den der Blausäurehemmungswert durch frühere Arbeiten noch nicht hinreichend genau festgelegt ist.

Die Versuche wurden mit demselben Hefestamm wie die Schwefelwasserstoffversuche ausgeführt, und auch im übrigen geschah alles, wie in Abschnitt III für aerobe Bedingungen beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, daß der Schwefelwasserstoff durch Blausäure ersetzt wurde.

Das Ergebnis der Messungen war:

HCN-Konzentration Mole/Liter	x_{O_2} in 30 Min. (1,4 mg Hefe) cmm	Hemmung der Atmung %
0	— 28,0	
$1 \cdot 10^{-5}$	— 8,7	70
$1 \cdot 10^{-4}$	0	100

IV. Die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Kohlensäureassimilation in Chlorella

wurde bei intensiver Bestrahlung einer dünnen Algensuspension und bei Überschuß von Kohlensäure untersucht, das heißt unter Bedingun-

gen, unter denen die Blackmansche Reaktion[1] die Geschwindigkeit der Assimilation bestimmt. Zur Messung dienten Gefäße nach Abb. 1. Die Lichtquelle war eine ½-Watt-Metallfadenlampe von 75 Watt Stromverbrauch, deren leuchtender Faden 8 cm vom Boden der Versuchsgefäße entfernt war.

Beträgt die Druckänderung bei Betrahlung H mm, so ist die allgemeine Formel zur Berechnung des entwickelten Sauerstoffs[2] x_{O_2} in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = H \frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} + \gamma K_{O_2}}, \tag{6}$$

wo $\gamma = \frac{x_{CO_2}}{x_{O_2}}$ ist. Ist γ unbekannt, so genügt ein Gefäß nicht zur Messung der Assimilation. Für unseren besonderen Fall jedoch — Chlorella bei intensiver Bestrahlung — lagen Bestimmungen von γ vor[3], so daß wir mit einem Gefäß auskamen. γ ist sehr nahe gleich $-0{,}9$, der entwickelte Sauerstoff in Kubikmillimetern also

$$x_{O_2} = H \frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} - 0{,}9\, K_{O_2}}.$$

Tabelle 3 enthält ein Versuchsbeispiel für die Schwefelwasserstoffkonzentrationen 0, 10^{-6}, 10^{-5} und 10^{-4} Mole/Liter. Das Ergebnis ist, daß 10^{-5} molar Schwefelwasserstoff die Kohlensäureassimilation — genauer die Blackmansche Reaktion — stark hemmt.

Tabelle 3. *Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Kohlensäureassimilation in Chlorella.*

Chlorella in Knopscher Lösung[4] bei 20°. In jedem Gefäß 2 mg Chlorella (Trockengewicht).

Gasraum	H_2S-Konzentration Mole/Liter	Gefäßvolumina v_F ccm	v_G ccm	Gefäßkonstanten K_{O_2}	K_{CO_2}	Beobachtete Druckänderungen mm	Entwickelter Sauerstoff (x_{O_2}) cmm	Hemmung %
5% CO_2 in Luft	0	8,0	5,54	0,54	1,21	— 136 in 20′	124	—
	10^{-6}	8,0	5,54	0,54	1,21	— 120 „ 20	109	12
	10^{-5}	8,0	5,54	0,54	1,21	— 38,5 „ 20	35	72
	10^{-4}	8,0	5,64	0,55	1,22	— 0,0 „ 20	—	100

[1] Vgl. diese Zeitschr. **146**, 486. 1924.

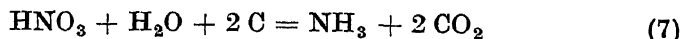
[2] Die Atmung der Chlorella beträgt bei intensiver Bestrahlung nur einige Prozente der Assimilation und kann vernachlässigt werden.

[3] Zeitschr. f. physik. Chem. **102**, 254. 1922.

[4] Zusammensetzung der Knopschen Lösung vgl. Zeitschr. f. physik. Chem. **102**, 235. 1922.

V. Die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Nitratassimilation in Chlorella.

Nach einer fruheren Arbeit ist die Gleichung der Nitratassimilation[1]

$$HNO_3 + H_2O + 2\,C = NH_3 + 2\,CO_2 \qquad (7)$$

ein Vorgang, der unter geeigneten Versuchsbedingungen so schnell verläuft, daß die nach Gleichung (7) entwickelte „Extrakohlensaure“ einen erheblichen Teil der gesamten entwickelten Kohlensaure ausmacht. Unter solchen Bedingungen kann man die Nitratassimilation durch Bestimmung der Extrakohlensaure messen

Zur Messung dienten zwei Gefaße nach Abb 1. Die Suspensionsflüssigkeit war eine Losung, die in bezug auf $NaNO_3$ n/10, in bezug auf freie Salpetersäure n/100 war, das sogenannte „Nitratgemisch“ Im Gasraum befand sich Luft, die Versuchsgefäße waren verdunkelt

Betrugen die Druckänderungen, die gleiche Zellmengen in gleichen Zeiten hervorbrachten, H mm (Gefaß I mit den Konstanten K_{O_2} und K_{CO_2}) und h mm (Gefaß II mit den Konstanten k_{O_2} und k_{CO_2}), so war der verbrauchte Sauerstoff x_{O_2} in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = \frac{h k_{CO_2} - H K_{CO_2}}{\frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}} - \frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}}},$$

die gebildete Kohlensaure x_{CO_2} — die Summe von Atmungskohlensäure und Extrakohlensaure — in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = \frac{h k_{O_2} - H K_{O_2}}{\frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}} - \frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}}}$$

und die gebildete Extrakohlensaure in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} + x_{O_2},$$

da nach fruheren Gasanalysen[2] fast genau soviel Atmungskohlensaure gebildet als Sauerstoff verbraucht wird.

Tabelle 4 enthält ein Versuchsbeispiel. Die Schwefelwasserstoffkonzentrationen waren 0 und 10^{-4} Mole/Liter. Das Ergebnis ist, daß 10^{-4} molar Schwefelwasserstoff die Extrakohlensäurebildung zum Verschwinden bringt, die Nitratassimilation also vollständig hemmt.

---

[1] Diese Zeitschr. **110**, 66. 1920

[2] Zeitschr. f physikal Chem. **102**, 254. 1922.

Tabelle 4. *Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Nitratassimilation in Chlorella.* Chlorella in Nitratgemisch bei 25°. Dunkel. In jedem Gefäß 16 mg Chlorella (Trockengewicht)

Gasraum	H_2S-Konzentration Mole/Liter	Gefäßvolumina v_F ccm	v_G ccm	Gefäßkonstanten für O_2	für CO_2	Beobachtete Druckänderungen mm	Sauerstoffverbrauch (x_{O_2}) cmm	Kohlensäurebildung (x_{CO_2}) cmm	Extrakohlensäure cmm	Hemmung der Nitratassimilation %
Luft	0	3,0	9,95	k_{O_2} = 0,92	k_{CO_2} = 1,14	$h = +3{,}5$ in 15′	— 25	+ 35	10	—
		8,0	5,54	K_{O_2} = 0,53	K_{CO_2} = 1,12	$H = -16$ in 15′				
Luft	10^{-4}	3,0	10,51	k_{O_2} = 0,97	k_{CO_2} = 1,19	$h = -5{,}5$ in 15′	— 26	+ 25,5	0	100
		8,0	5,64	K_{O_2} = 0,54	K_{CO_2} = 1,12	$H = -25$ in 15′				

VI. Die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Atmung in Chlorella.

Zur Messung der Atmung bei Gegenwart von Schwefelwasserstoff dienten zwei Gefäße nach Abb 1. Betrugen die Druckänderungen, die gleiche Zellmengen in gleichen Zeiten hervorbrachten H mm (Gefäß I mit den Kontanten K_{O_2} und K_{CO_2}) und h mm (Gefäß II mit den Konstanten k_{O_2} und k_{CO_2}) so war der verbrauchte Sauerstoff x_{O_2} in Kubikmillimetern

$$x_{O_2} = \frac{h\,k_{CO_2} - H\,K_{CO_2}}{\frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}} - \frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}}}$$

und die gebildete Atmungskohlensäure x_{CO_2} in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = \frac{h\,k_{O_2} - H\,K_{O_2}}{\frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}} - \frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}}}$$

Zur Messung der Atmung bei Abwesenheit von Schwefelwasserstoff begnügte ich mich mit einem Gefäß, setzte den respiratorischen Quotienten nach früheren Messungen[1] gleich — 1 und berechnete den Sauerstoffverbrauch x_{O_2} in Kubikmillimetern aus der beobachteten Druckänderung H nach der Gleichung

$$x_{O_2} = H\,\frac{K_{CO_2} \cdot K_{O_2}}{K_{CO_2} - K_{O_2}}.$$

[1] Zeitschr f. physikal. Chem. **102**, 254. 1922.

Tabelle 5 enthalt ein Versuchsbeispiel Die Schwefelwasserstoffkonzentrationen waren 0 und 10^{-4} Mole/Liter. Das Ergebnis ist, daß 10^{-4} molar Schwefelwasserstoff die Atmung nicht nur nicht hemmt, sondern sogar beschleunigt, und daß der respiratorische Quotient der gesteigerten Atmung gleich dem der normalen Atmung ist

Tabelle 5 *Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Atmung in Chlorella.*
Chlorella in Knopscher Losung[1] bei 20°. Dunkel. In jedem Gefaß 12 mg Chlorella (Trockengewicht)

Gasraum	H_2S-Konzentration Mole/Lit.	Gefaßvolumina v_F ccm	Gefaßvolumina v_G ccm	Gefaßkonstanten fur O_2	Gefaßkonstanten fur CO_2	Beobachtete Druckanderungen mm	Verbrauchter Sauerstoff (x_{O_2}) cmm	Gebildete Kohlensaure (x_{CO_2}) cmm	
Luft	0	8,0	5,54	$K_{O_2} = 0{,}54$	$K_{CO_2} = 1{,}21$	$h = -18$ in 15′	−18	+18	Keine Hemmung der Atmung, sondern Steigerung auf das 1,8fache
Luft .	10^{-4}	3,0	9,28	$k_{O_2} = 0{,}87$	$k_{CO_2} = 1{,}12$	$h = -8$ in 15′	−32	+32	
		8,0	5,64	$K_{O_2} = 0{,}55$	$K_{CO_2} = 1{,}22$	$H = -31{,}5$ in 15′			

VII. Vergleich der Blausäure- und Schwefelwasserstoffwirkung.

Zum Schluß vergleichen wir die Wirkungen, die Blausaure und Schwefelwasserstoff bei gleicher Konzentration hervorbringen, und wahlen als Vergleichskonzentration 10^{-4} Mole/Liter Es ergibt sich folgendes:

	Es bewirkt 10^{-4} mol. H_2S	Es bewirkt 10^{-4} mol. HCN
Atmung in Hefezellen	Vollkommene Hemmung	Vollkommene Hemmung
Gärung in Hefezellen	Keine Hemmung	Keine Hemmung[2]
Kohlensaureassimilation in Chlorella .	Vollkommene Hemmung	Starke Hemmung[3]
Nitratassimilation in Chlorella .	Vollkommene Hemmung	Vollkommene Hemmung[4]
Atmung in Chlorella	Steigerung	Steigerung[5]

Das Ergebnis ist, daß ein weitgehender Parallelismus zwischen den Wirkungen der Blausaure und des Schwefelwasserstoffs besteht.

[1] Zusammensetzung der Knopschen Losung vgl Zeitschr. f physik. Chem. **102**, 235. 1922.
[2] Diese Zeitschr , die vorhergehende Arbeit.
[3] Ebendaselbst **146**, 488 1924.
[4] Ebendaselbst **110**, 81. 1920.
[5] Ebendaselbst **100**, 267 1919.

Die Atmung der Chlorella wird — als bisher einziger Fall von Atmung — durch kleine Blausäurekonzentrationen nicht nur nicht gehemmt, sondern sogar beschleunigt, und die gleiche Wirkung bringt in diesem Falle Schwefelwasserstoff hervor, der in anderen Fällen wie Blausäure die Atmung hemmt. Die alkoholische Gärung ist, wie alle Gärungen, gegen Blausäure erheblich unempfindlicher als die Atmung und ist es auch gegenüber Schwefelwasserstoff. Hierbei ist sogar das Verhältnis zwischen atmungs- und gärungshemmender Konzentration von derselben Größenordnung, denn wir finden

	Es hemmen die Hefeatmung Mole/Liter	Es hemmen die Hefegärung Mole/Liter	Verhältnis
Blausäure	10^{-5}	10^{-2}	1 : 1000
Schwefelwasserstoff	10^{-5}	$0.6 \cdot 10^{-2}$	1 : 600

Für die Anregung zu dieser Arbeit spreche ich Herrn O. Warburg meinen Dank aus.

Biochem. Zeitschr. 172, 17. 1926.

Über die Wirkung von Blausäureäthylester (Äthylcarbylamin) auf Schwermetallkatalysen.

Von

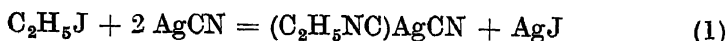
Shigeru Toda.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 11. Marz 1926.)

Mit 6 Abbildungen.

Die Blausaureester sind im Jahre 1866 von GAUTIER entdeckt worden. Er erhielt sie bei der Einwirkung von Jodalkyl auf Cyansilber.

$$C_2H_5J + 2\,AgCN = (C_2H_5NC)AgCN + AgJ \tag{1}$$

als komplexe Silberverbindungen, die durch Cyankalium unter Bildung von freiem Blausaureester und komplexem Silbercyanid zerlegt werden. Was die Konstitution der Blausaureester anbetrifft, so nimmt man seit NEF an, daß der Kohlenstoff in ihnen, wie in der freien Blausaure zweiwertig ist

$$\underset{\text{Blausaure}}{HN = C} \qquad \underset{\text{Äthylcarbylamin}}{C_2H_5N = C}$$

Die Blausaureester sind bestandig in neutraler und alkalischer Losung — aus der sie unzersetzt destilliert werden konnen — aber unbestandig in saurer Losung. Sie zerfallen in saurer Losung jedoch nicht in Blausäure und Alkohol, was mit Hinblick auf ihre biologische Wirkung hervorgehoben sei, sondern in Ameisensaure und Amin. Beispielsweise reagiert Äthylcarbylamin nach der Gleichung

$$C_2H_5NC + 2\,H_2O = C_2H_5NH_2 + HCOOH, \tag{2}$$

wenn man eine wasserige schwefelsaure Losung kurze Zeit bei Zimmertemperatur stehenlaßt. Auf dieser Reaktion, die quantitativ verlauft, beruht eine Methode[1] zur Bestimmung der Blausaureester. Man zerlegt sie mit Säure, macht alkalisch, destilliert und titriert das ubergehende Amin.

Von anderen Eigenschaften der Blausäureester ist bemerkenswert, daß sie mit Schwermetallen, wie die freie Blausaure, komplexe Verbindungen bilden. Eine eingehende Untersuchung darüber verdanken

[1] GUILLEMARD, H. Ann. Chim. et Phys. 14, 311. 1908.

wir K. A. Hofmann[1], der beispielsweise eine Verbindung von Ferrochlorid (2 Molekülen) und Äthylcarbylamin (3 Molekülen) herstellte, die, in Wasser gelöst, weder mit Silber die Chlorreaktion, noch mit Ferricyankalium die Eisenreaktion gab. Auf Grund solcher Beobachtungen war zu erwarten, daß die Ester der Blausäure, ähnlich wie die freie Blausäure, Schwermetallkatalysen hemmen. Ich habe diese Frage auf Vorschlag von Herrn Otto Warburg geprüft und untersucht, in welcher Weise der Äthylester der Blausäure — Äthylcarbylamin — auf die Oxydation des Cysteins und der Fructose in wässeriger Lösung sowie auf die Oxydation des Leucins an Häminkohle wirkt.

I. Reinigung des Äthylcarbylamins.

Das Rohprodukt, von dem ich ausging, war Kahlbaumsches Äthylcarbylamin. Es enthielt, wie alle nach Gautier dargestellten Carbylamine, als Verunreinigung Blausäure und Nitril. Die Blausäure war durch Destillation von dem Carbylamin nicht zu trennen.

Um die Blausäure in dem Carbylamin zu bestimmen, stellte ich eine n/10 wässerige Lösung her (5,5 g/1000 ccm). Zu 10 ccm dieser Lösung fügte ich 2 ccm 25proz. Ammoniak[2] und 0,5 ccm 32proz. Jodkaliumlösung, verdünnte mit Wasser auf 100 ccm und ließ so lange n/100 Silbernitrat zufließen, bis Opaleszenz auftrat. 10 ccm der Lösung verbrauchten beispielsweise 0,56 ccm n/100 Silbernitrat, was 1,2 ccm n/100 Blausäure entspricht.

In anderen Versuchen zerlegte ich dieselbe Carbylaminlösung zunächst mit dem gleichen Volumen n Schwefelsäure (1 Stunde Zimmertemperatur) zu Amin und Ameisensäure, destillierte dann die Blausäure in eine eisgekühlte Wasservorlage und titrierte sie in der Vorlage nach Denigès mit n/100 Silbernitrat. Bei dieser Anordnung erhielt ich die gleiche Blausäuremenge aus 10 ccm n/10 Carbylamin: 1,2 ccm n/100 Blausäure. Auf je 100 Moleküle Carbylamin kam also in einem Kahlbaumschen Präparat, das destilliert war, 1 Molekül Blausäure. Man sieht daraus, wie wichtig es ist, bei allen Versuchen mit Blausäureestern die freie Blausäure zu entfernen. Wie es scheint, geschah dies nicht in den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen.

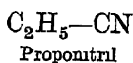
Zur Entfernung der Blausäure schüttelte ich 50 ccm Äthylcarbylamin im Scheidetrichter 10 Minuten lang zweimal mit 10 ccm n Natronlauge, ein drittes Mal mit Wasser und destillierte dann zweimal, wobei das Carbylamin bei 78° überging. Dieses Präparat erwies sich, nach Denigès in der beschriebenen Weise geprüft, als frei von Blausäure.

[1] Hofmann, K. A. u. G. Bugge: Ber. 40, 3759. 1907.
[2] Methode von Denigès.

Um einen Gehalt an Nitril festzustellen, fuhrte ich das Carbylamin mit Schwefelsaure in Amin und Ameisensaure uber und titrierte das Amin 10 ccm einer n/10 Carbylaminlosung wurden mit 10 ccm n Schwefelsaure gemischt und blieben bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehen Dann war der Geruch nach Carbylamin verschwunden Ich fugte 20 ccm zweifach n Natronlauge und 10 ccm Wasser hinzu und destillierte das gebildete Äthylamin in vorgelegte n/10 Schwefelsaure Der Titerverlust der Schwefelsaure, gegen Methylrot bestimmt, betrug 9,8 ccm n/10 Saure Mein Praparat enthielt also sicher nicht mehr als 2% Nitril, eine Verunreinigung, die, wie aus dem Folgenden hervorgeht, fur meine Zwecke belanglos war

II. Reinigung des Valeronitrils.

Neben Carbylamin habe ich auch Nitrile auf Schwermetallkatalysen einwirken lassen, und zwar Propionitril, das dem Äthylcarbylamin isomer ist, und ein Valeronitril

$C_2H_5{-}CN$ Propionitril $(CH_3)_2\ CH \cdot CH_2CN$ Valeronitril

Wie die Carbylamine mit Nitrilen und Blausaure, so sind die Nitrile oft mit Carbylaminen und Blausaure verunreinigt Das Propionitril von KAHLBAUM war frei von Carbylamin und Blausaure Das Kahlbaumsche Valeronitril der oben angeschriebenen Formel enthielt sowohl Carbylamin als auch Blausaure und mußte deshalb gereinigt werden

Zur Entfernung des Carbylamins schuttelte ich 50 ccm Valeronitril mit 50 ccm n Schwefelsaure 6 Stunden auf der Schuttelmaschine Dann war der Geruch nach Carbylamin verschwunden Ich extrahierte das Nitril (das bei Zimmertemperatur gegen Sauren ganz bestandig ist) mit Ather, trocknete den Ather mit Natriumsulfat und fraktionierte, wobei die bei 127—128° ubergehende Fraktion aufgefangen wurde Die Titration nach DENIGES zeigte, daß das so gewonnene Nitril noch erhebliche Mengen Blausaure enthielt Obwohl die Siedepunkte der Blausaure und des Valeronitrils weit auseinanderliegen, kann die Blausaure durch Destillation nicht entfernt werden

Zur Entfernung der Blausaure schuttelte ich 40 ccm des carbylaminfreien Nitrils 5 Minuten mit 10 ccm zweifach n Natronlauge im Schutteltrichter Dann wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und destilliert Das ubergehende Nitril war blausaurefrei. Eine Losung in Wasser, nach DENIGES mit n/100 Silbernitrat versetzt, verbrauchte bis zur Opaleszenz nicht mehr Silber als reines Wasser.

III. Die Wirkung von Carbylamin und Valeronitril auf die Cysteinoxydation.

Löst man eisenhaltiges Cysteinchlorhydrat in Wasser, neutralisiert mit Ammoniak, bis p_H etwa 8 ist, und schüttelt mit Luft, so tritt die violette Farbe der komplexen Eisen-Cysteinverbindung auf, in der das Eisen dreiwertig ist. Diese Färbung verschwindet auf Zusatz von Blausäure, und sie verschwindet auch, wie ich beobachtet habe, auf Zusatz von Äthylcarbylamin. Es ist bekannt, daß im Falle der Blausäurewirkung Entfärbung und Oxydationshemmung parallel gehen. Ich habe gefunden, daß das gleiche für die Carbylaminwirkung gilt.

Für meine quantitativen Versuche benutzte ich Cysteinchlorhydrat, das aus der dreifachen Menge heißen Äthylalkohols umkristallisiert war. Die Hauptmenge des im Rohcystein vorhandenen Eisens blieb bei dieser Reinigung im Alkohol zurück, und ich erhielt ein Präparat, das sich mit einer für meine Zwecke geeigneten Geschwindigkeit oxydierte. Zur Neutralisation verwendete ich nach SAKUMA[1] gereinigtes Ammoniak. Die Geschwindigkeit der Oxydation bestimmte ich manometrisch, wie bei SAKUMA[1] beschrieben.

In Tabelle 1 und Abb. 1 ist ein Versuchsbeispiel wiedergegeben, in dem die Cysteinoxydation bei den Carbylaminkonzentrationen 0 und 10^{-4} und 10^{-3} n gemessen wurde. Fassen wir zunächst die ersten 120 Minuten ins Auge, so sehen wir, daß 10^{-4} n Carbylamin um 35%, 10^{-3} n Carbylamin vollständig hemmt. Dies ist dieselbe Größenordnung der Konzentration, in der Blausäure die Oxydation mäßig verunreinigter Cysteinlösungen hemmt.

Tabelle 1. *Cystein und Äthylcarbylamin.*
p_H = etwa 8. Gasraum Luft. Temperatur 20°.

Minuten	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O O_2 in cmm	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/1000 C_2H_5—NC O_2 in cmm	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/10000 C_2H_5—NC O_2 in cmm
20	4,8	0,0	1,8
40	7,6	0,0	3,6
60	12,4	0,0	7,2
80	16,2	0,9	9,9
100	20,0	0,9	13,5
120	23,8	0,9	15,3
	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Fe	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Fe	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Fe
140	72,2	16,2	64,8
160	116,9	24,3	110,7
180	155,8	31,5	147,6

[1] SAKUMA, S., diese Zeitschr. **142**, 68. 1923.

Nach Ablauf von 120 Minuten wurden in jedes Gefaß $2 \cdot 10^{-3}$ mg Eisen (in Form von Ferrosulfat) zugegeben Die Konzentration an Eisen war dann $0{,}4 \cdot 10^{-5}$ n. Mit dem Eisengehalt stieg, wie Tabelle 1 und Abb 1 lehren, die Geschwindigkeit der Oxydation, und zwar in 10^{-4} n Carbylamin in etwa demselben Maße, wie in der carbylamin-

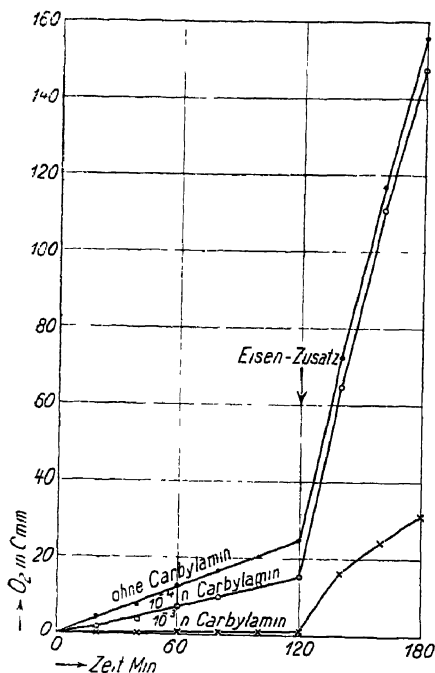



Abb 1 Cysteinoxydation in wasseriger Losung

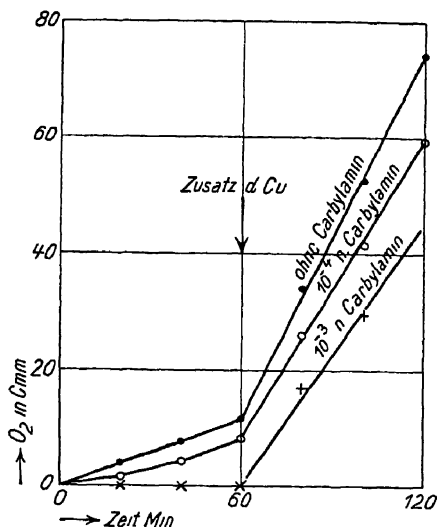



Abb 2 Cysteinoxydation in wasseriger Losung.

freien Kontrolle 10^{-4} n Carbylamin war also nicht imstande, die Wirkung von $0{,}4 \cdot 10^{-5}$ n Eisen aufzuheben Dagegen hemmte 10^{-3} n Carbylamin die Wirkung des zugesetzten Eisens sehr stark, zunachst um 67%, spater um 82%

Tabelle 2. *Cystein und Äthylcarbylamin.*

p_H = etwa 8 Gasraum Luft Temperatur 20°

Minuten	7 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O O_2 in cmm	7 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/1000 C_2H_5—N . C O_2 in cmm	7 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/10000 C_2H_5—N · C O_2 in cmm
20	3,8	0,0	1,8
40	7,6	0,0	4,5
60	11,4	0,0	8,1
	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Cu	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Cu	← $2 \cdot 10^{-3}$ mg Cu
80	34,2	17,1	26,1
100	52,3	29,7	41,4
120	74,1	45,0	59,4

Der Versuch der Tabelle 2 und der Abb 2 unterscheidet sich von dem beschriebenen dadurch, daß Kupfersulfat statt Ferrosulfat zugegeben wurde Wie man sieht, wird auch die Kupferkatalyse durch Äthylcarbylamin gehemmt, aber betrachtlich schwacher als die Eisenkatalyse

Die Versuche beweisen, daß Carbylamin die sauerstoffubertragende Wirkung von Schwermetall in ahnlichem Maße hemmt wie Blausaure Daß Kohlenstoffverbindungen, die keine komplexen Schwermetallverbindungen bilden, eine derartige Wirkung nicht hervorbringen, ist kaum nötig zu erwähnen Valeronitril (Tabelle 3) hat selbst in n/10 Losung keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Oxydation.

Tabelle 3. *Cystein und Valeronitril.*
p_H = etwa 8. Gasraum Luft. Temperatur 20°.

Minuten	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/10 Valeronitril	8 mg Cystein-HCl 10 ccm H_2O n/100 Valeronitril
	O_2 in cmm	O_2 in cmm	O_2 in cmm
10	1,8	1,7	1,7
20	4,5	4,3	4,3
30	6,3	6,0	6,0
40	8,1	8,5	8,5
60	13,7	12,4	12,9
80	18,0	17,0	17,0
100	23,4	22,1	22,1

IV. Die Wirkung von Äthylcarbylamin auf die Fructoseoxydation in Phosphat.

Die von Warburg und Yabusoe[1] entdeckte Verbrennung der Fructose in Phosphatlosungen ist nach Versuchen von Meyerhof und Matsuoka[2] sowie nach Versuchen von F Wind[3] ein durch Schwermetall beschleunigter Vorgang da Komplexbildner die Oxydation hemmen Schwermetalle die Oxydation beschleunigen

Tabelle 4 *Fructose-Phosphat und Äthylcarbylamin*
37,5° Gasraum Luft

Minuten	5 ccm Fructose-Phosphatlosung	5 ccm Fructose-Phosphatlosung n/1000 C_2H_5—N C	5 ccm Fructose-Phosphatlosung n/10000 C_2H_5—N C
	O_2 in cmm	O_2 in cmm	O_2 in cmm
20	47,3	21,0	20,0
40	108,2	49,0	47,3
60	171,2	77,0	75,6

[1] Diese Zeitschr. 146, 380. 1924. [2] Ebendaselbst 150, 1. 1924.
[3] Ebendaselbst 159, 58. 1925.

Fur meine Versuche benutzte ich m/2 Phosphatlosungen, deren p_H etwa 8 war Die Fructosekonzentration betrug 5% Die Messung der Oxydationsgeschwindigkeit geschah manometrisch, wie bei WARBURG und YABUSOE[1] beschrieben

Tabelle 4 enthalt ein Versuchsbeispiel 10^{-4} n Carbylamin hemmt die Oxydation um 50%

Auffallenderweise hemmt 10^{-3} n Carbylamin nicht starker als 10^{-4} n Carbylamin Ich erklare dies durch die Annahme, daß unter den verschiedenen Metallen, die das Fructosephosphatgemisch enthalt, solche sind, die mit Carbylamin reagieren, und solche, die nicht reagieren

V. Die Wirkung von Äthylcarbylamin auf die Oxydation des Leucins an Häminkohle.

Nach WARBURG und BREFELD[2] hemmt 10^{-3} n Blausaure die sauerstoffubertragende Wirkung des in der Haminkohle gebundenen Eisens um rund 90%. Wie ich gefunden habe, hemmt Äthylcarbylamin die katalytische Wirkung der Haminkohle in Konzentrationen von der gleichen Großenordnung, namlich 10^{-4} n Carbylamin um 35% und 10^{-3} n Carbylamin um 67%

Die Messung geschah manometrisch[3], wie bei WARBURG und BREFELD beschrieben Ein Versuchsbeispiel ist in Tabelle 5 und Abb 3 wiedergegeben

Tabelle 5 *Haminkohle, Leucin und Äthylcarbylamin.* 37,5°. Gasraum Luft.

Minuten	10 mg Haminkohle 10 ccm n/20 Leucin O_2 in cmm	10 mg Haminkohle 10 ccm n/20 Leucin n/1000 C_2H_5—H C O_2 in cmm	10 mg Haminkohle 10 ccm n/20 Leucin n/10000 C_2H_5—N C O_2 in cmm
10	8,1	1.7	5,1
20	18,9	5,1	11,9
30	26,1	7,7	18,7
40	36,0	10,2	23,8
50	43,2	12,8	29,8
60	54,0	15,3	37,4
70	63,0	18,7	40,8
80	70,2	22,1	45,9
90	80,1	25,5	51,0
100	87,3	27,2	56,1
110	96,3	30,6	62,1
120	104,4	34,0	68,0

[1] Diese Zeitschr **146**, 380 1924 [2] Ebendaselbst **145**, 461. 1924.

[3] In den Ber. d Chem Ges. **59**, 218. 1926 kritisiert S. HENNICHS die manometrische Methode. Aus der Kritik geht hervor, daß HENNICHS nicht einmal das Prinzip der Methode verstanden hat. Die Methode ist die einzige quantitative, uber die wir verfügen, und besitzt außerdem den Vorzug, daß mit ihr die Erscheinungen, über die HENNICHS schreibt, entdeckt worden sind.

Um zu entscheiden, ob hier — wo ein heterogenes System gehemmt wurde — eine spezifische Wirkung oder eine unspezifische Oberflachenwirkung (narkotische Wirkung) vorlag, war es notwendig, die Adsorption des Carbylamins zu messen.

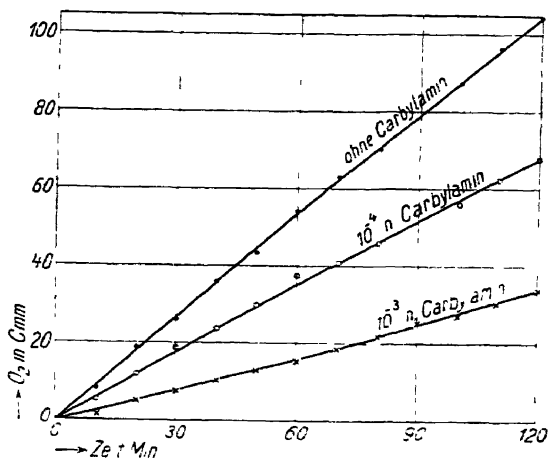



Abb 3 Leucinoxydation an Häminkohle

VI. Adsorption von Äthylcarbylamin und einigen Nitrilen an Kohle.

50 ccm n/10 Carbylaminlosung wurden mit 1 g Merckscher Blutkohle 5 Minuten geschuttelt 10 ccm des Kohlefiltrats wurden mit 10 ccm n Schwefelsaure gemischt und blieben eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen Dann wurde mit 20 ccm zweifach n Natronlauge alkalisch gemacht, destilliert und das ubergegangene Athylamin mit Methylrot als Indikator titriert

10 ccm Carbylaminlosung gaben vor dem Schutteln mit Kohle 9,8 ccm n/10 Base

10 ccm Carbylaminlosung gaben nach dem Schutteln mit Kohle 4,67 ccm n/10 Base

Aus diesen Zahlen berechnen wir die Anzahl Millimole x die an 1 g Kohle adsorbiert sind, wenn die Carbylaminkonzentration in der Losung c Mole pro Liter betragt und finden

c (Mole Liter)	x (Millimole g)
$4{,}67 \cdot 10^{-2}$	2,6

Weiterhin wurde die Adsorption von Propionitril, das dem Äthylcarbylamin isomer ist, gemessen. Zur Bestimmung des Nitrils wurde

die Nitrillösung mit dem gleichen Volumen n Schwefelsäure gemischt und 5 Stunden bei 150⁰ im Rohr erhitzt Dann war das Nitril zu propionsaurem Ammon verseift, und das Ammoniak konnte abdestilliert und titriert werden

Wurden 50 ccm n/10 Propionitrillösung mit 1 g Kohle bis zum Gleichgewicht geschüttelt, so gaben 10 ccm Kohlefiltrat 6,0 ccm n/10 Ammoniak, während 10 ccm der gleichen, aber nicht mit Kohle geschüttelten Lösung 9,8 ccm n/10 Ammoniak lieferten. Daraus berechnen wir für Propionitril

c (Mole/Liter)	x (Millimole/g)
$6 \cdot 10^{-2}$	1,9

Schließlich wurde die Adsorption von Valeronitril gemessen Die Bestimmung geschah stalagmometrisch nach dem Verfahren von J. Traube. Lösungen verschiedener Valeronitrilkonzentration wurden in ein Traubesches Stalagmometer eingefüllt, je 10 der frei abfallenden Tropfen wurden gewogen. Hierbei erhielt ich folgende Zahlen

Konzentration des Valeronitrils	Gewicht von 10 Tropfen g
0	1,2194
n/30	0,9941
n/20	0,9328
n/15	0,8907
n/10	0,8105

Wurden 50 ccm einer n/10 Valeronitrillösung mit 1 g Kohle bis zum Gleichgewicht geschüttelt, so wogen 10 Tropfen des Kohlefiltrats 1,047 g Das 10-Tropfengewicht stieg also durch die Behandlung mit Kohle von 0,8105 g auf 1,047 g Die Konzentrationsänderung, die dieser Gewichtsänderung entsprach, wurde graphisch ermittelt Es ergaben sich daraus folgende x- und c-Werte.

c (Mole/Liter)	x (Millimole/g)
$3,1 \cdot 10^{-2}$	3,45

Stellen wir das Ergebnis der Adsorptionsmessungen zusammen, so haben wir:

	c (Mole/Liter)	x (Millimole/g)
Propionitril . .	$6,0 \cdot 10^{-2}$	1,9
Äthylcarbylamin	$4,7 \cdot 10^{-2}$	2,6
Valeronitril .	$3,1 \cdot 10^{-2}$	3,5

Äthylcarbylamin steht also zwischen Propionitril und Valeronitril. Es wird starker adsorbiert als Propionitril, aber schwacher als Valeronitril

VII. Wirkung der Nitrile auf die Oxydation des Leucins an Häminkohle.

Wäre die Wirkung des Äthylcarbylamins auf Haminkohle eine unspezifische Oberflachenwirkung, so müßte es nach Abschnitt VI stärker als Propionitril, aber schwächer als Valeronitril wirken Ich habe die Oxydation des Leucins an Häminkohle unter dem Einfluß verschiedener Nitrilkonzentrationen gemessen und diejenigen Konzentrationen gemessen und diejenigen Konzentrationen an Propionitril und Valeronitril ermittelt, die die Oxydationsgeschwindigkeit um etwa 50% hemmen

Das Resultat ist in den Tabellen 6 und 7 sowie den Abb. 4 und 5 zusammengestellt Wie man sieht, ist von Propionitril eine

Tabelle 6 *Haminkohle. Leucin und Propionitril.*
37.5°. Gasraum Luft.

Minuten	10 mg Haminkolhe 10 ccm n 20 Leucin O_2 in cmm	10 mg Häminkohle 10 ccm n 20 Leucin 1,7 10 n Propionitril O_2 in cmm
10	8.5	1 7
20	19.3	7 7
30	28.3	12 8
40	40 0	20 4
50	51.7	25.5
60	64.3	31.5
70	78.7	37 4
80	93.1	44 2
90	108.4	51 9

Tabelle 7 *Haminkohle, Leucin und Valeronitril* 37.5° Gasraum Luft.

Minuten	10 mg Hamin-kohle, 10 ccm n/20 Leucin O_2 in cmm	10 mg Hamin-kohle, 10 ccm n 20 Leucin, 2/100 n Valero-nitril O_2 in cmm	10 mg Hamin-kohle, 10 ccm n 20 Leucin, 3/100 n Valero-nitril O_2 in cmm	10 mg Hamin-kohle, 10 ccm n 20 Leucin, 4/100 n Valero-nitril O_2 in cmm
10	9.9	2,0	2,6	1,4
20	19.4	5,1	3,9	1,9
30	29.7	10.2	6,8	4,1
40	40.5	16,2	11.9	7,7
50	51,3	20,0	16,2	10,4
60	62.1	26,4	19.6	12,2
70	73.8	32.3	24.7	15,8
80	83.7	39.1	28,9	18,5
90	94,5	45.9	34,0	23,0

0,17 n Lösung, von Valeronitril eine 0,02 n Lösung nötig, um die Geschwindigkeit der Leucinoxydation auf die Hälfte zu vermindern.

Demgegenüber ergibt der Versuch der Abb. 3 mittels graphischer Interpolation, daß von Äthylcarbylamin eine $4 \cdot 10^{-4}$ n Lösung nötig

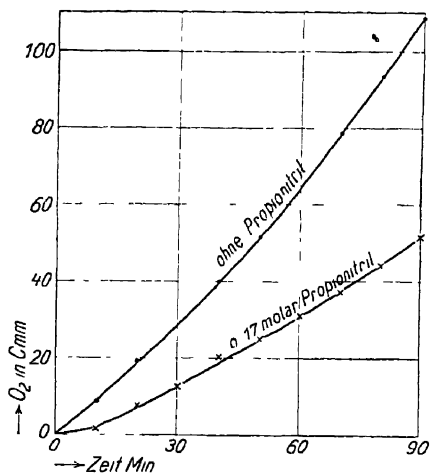
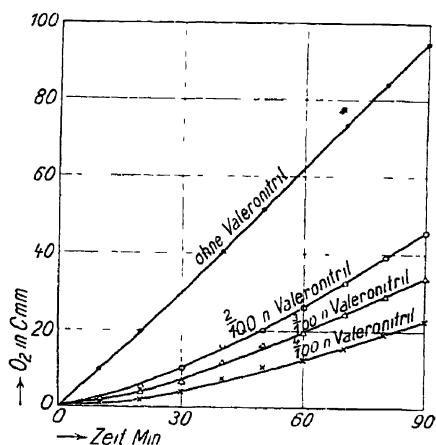



Abb. 4. Leucinoxydation an Häminkohle Abb. 5. Leucinoxydation an Häminkohle

ist, um die Leucinoxydation um 50% zu hemmen. Die Wirkungsstärke des Äthylcarbylamins liegt also nicht zwischen den Wirkungsstärken des Propionitrils und Valeronitrils, sondern ist viel größer. Äthylcarbylamin wirkt 500mal stärker als das isomere Propionitril und 50mal stärker als Valeronitril. Die Wirkung des Äthylcarbylamins auf Häminkohle ist keine unspezifische Oberflächenwirkung, vielmehr liegt eine spezifische Reaktion mit dem Metall der Häminkohle zugrunde, wie es nach der Übereinstimmung zwischen den Wirkungsstärken der Blausäure und des Carbylamins von vornherein wahrscheinlich war.

VIII. Die Wirkung von Äthylcarbylamin auf Leberkatalase.

Auch mit der biologischen Wirkung des Äthylcarbylamins habe ich mich beschäftigt und geprüft, ob Äthylcarbylamin das wasserstoffperoxydspaltende Ferment der Leber beeinflußt.

Ratten wurden durch Nackenschlag getötet. Die Leber wurde vom Herzen aus, nach der Vorschrift von MUNEO YABUSOE[1], mittels körperwarmer Ringerlösung blutfrei gespült. Von der hellgelben Leber wurden Schnitte von etwa 0,3 mm Dicke hergestellt.

[1] Diese Zeitschr. **157**, 388. 1925.

8,5 ccm Na_2HPO_4-Lösung und 1,5 ccm NaH_2PO_4-Losung, beide dem Rattenserum isoton, wurden gemischt und mit 0,9proz Kochsalzlosung auf 100 ccm verdünnt. Je 10 ccm dieser Losung wurden in Gefaße von der Form der Abb. 6 eingefüllt[1] Die Ansatzbirne A enthielt 0,5 ccm 0,299proz. Wasserstoffsuperoxyd, das nach W. FRIEDERICH aus Natriumperoxyd hergestellt und im Vakuum destilliert war. Der Einsatz der Gefaße blieb leer.

Abb 6

In den Hauptraum *F* der so vorbereiteten Gefaße wurde je ein Leberschnitt eingebracht. Dann wurden die Gefäße mit Manometern verbunden und bei 37,5° im Thermostaten geschüttelt. War Temperatur- und Druckgleichgewicht eingetreten, so wurde das Wasserstoffperoxyd aus den Ansatzbirnen eingekippt und die von der Wasserstoffperoxydzersetzung herrührenden Sauerstoffdrucke beobachtet

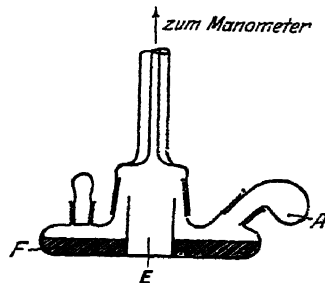



Tabelle 8 enthalt ein Versuchsbeispiel, in dem die Konzentrationen an Äthylcarbylamin 0 und 10^{-4} n und 10^{-3} n waren Wie man sieht zersetzt die Leber das zugefugte Wasserstoffperoxyd schnell. Nach 30 Minuten sind etwa 400 cmm Sauerstoff erschienen wahrend fur vollstandigen Zerfall 495 cmm Sauerstoff berechnet sind

Tabelle 8 *Leberkatalase und Äthylcarbylamin*
37 5° Gasraum Luft

Im Hauptraum				
Losung	10 ccm	10 ccm	10 ccm	10 ccm
Athylcarbylamin	0	0	10^{-4} n	10^{-3} n
Lebertrockengewicht	0	2 23 mg	2 15 mg	2 10 mg
In der Ansatzbirne				
0,299% H_2O_2	0 5 ccm	0 5 ccm	0 5 ccm	0 5 ccm
Zeit nach Einkippen des Peroxyds (Minuten)	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2	cmm O_2
10	0	189	206	201
20	0	352	379	361
30	0	403	421	392
cmm O_2 / mg Leber-Minuten	0	8 5	9,5	9 6

Athylcarbylamin hemmt die wasserstoffperoxydspaltende Wirkung der Leber nicht Rechnet man die Anfangsgeschwindigkeiten auf

[1] Die Methode ist zuerst beschrieben in dieser Zeitschr. 146, 486. 1924.

gleiche Lebergewichte um — die Lebertrockengewichte sind in der Tabelle angegeben —, so erhalt man fur die Quotienten

$$\frac{\text{Kubikmillimeter } O_2}{\text{Milligramm Leber} \cdot \text{Minuten}}$$

bei Gegenwart von Carbylamin sogar etwas hohere Werte als bei Abwesenheit von Carbylamin

IX. Giftigkeit des Äthylcarbylamins im Vergleich zur Giftigkeit der Blausäure.

Zum Schluß seien einige Zahlen angefuhrt, aus denen hervorgeht, daß Äthylcarbylamin ungiftiger ist als Blausaure

Für meine Versuche benutzte ich Losungen von Blausaure oder Äthylcarbylamin in Ringerlosung, die ich Ratten subcutan injizierte. Das Ergebnis meiner Beobachtungen stelle ich in Tabelle 9 zusammen. Die Grenzen, bei denen keine deutlichen Wirkungen mehr auftraten, sind fur Blausaure 0,5 ccm n/100, fur Athylcarbylamin 0,5 ccm n/10, bei einem Rattengewicht von etwa 100 g Äthylcarbylamin ist also rund zehnmal ungiftiger als Blausaure

Tabelle 9

Substanz	Rattengewicht g	Injizierte Flussigkeit	Wirkung
Blausaure	110	0,5 n/10	nach 1 Minute tot
	90	0,5 n/50	nach 15 Minuten schwere Erscheinungen, aber wieder Erholung
	90	0,5 n/100	keine deutliche Wirkung
Athylcarbylamin . .	105	1,5 n/10	nach 20 Minuten tot
	100	1,0 n/10	nach 30 Minuten tot
	95	0,5 n/10	wirkt nicht

Biochem. Zeitschr. 172, 34. 1926

Über „Wasserstoffaktivierung“ durch Eisen.

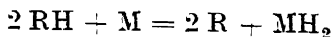
Von

Shigeru Toda.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 13. März 1926.)

Neutralisiert man eine Cysteinchlorhydratlösung mit Ammoniak, bis p_H etwa 8 ist, und mischt sie mit einer Methylenblaulösung, so findet man, daß die blaue Lösung bei Zimmertemperatur allmählich heller und schließlich farblos wird. Cystein (RH) wird durch Methylenblau (M) oxydiert, wobei das Methylenblau in Methylenweiß (MH_2) übergeht. Die Bilanzgleichung ist

$$2\,RH + M = 2\,R + MH_2$$

Obwohl der Mechanismus derartiger und ähnlicher Vorgänge unbekannt ist, nehmen viele Naturforscher an, daß gerade hier die Bilanzgleichung über den Mechanismus Aufschluß gibt. Im Falle der Cysteinoxydation durch Methylenblau denken sie sich, daß der Wasserstoff der SH-Gruppe, weil er „aktiv“ oder „aktiviert“ sei, direkt mit dem Farbstoff reagiere.

Herr Warburg machte mich darauf aufmerksam, daß diese einfache Annahme zum mindesten hinsichtlich der Reaktion zwischen Cystein und Methylenblau unrichtig ist, da, wie er beobachtet hatte, die Reaktion durch Blausäure gehemmt wird. Ich habe auf seinen Vorschlag die Reaktion näher untersucht und festgestellt, daß eine Schwermetallkatalyse vorliegt.

Für meine Versuche benutzte ich Cysteinchlorhydrat, das durch Reduktion von Cystin mit Zinn und Salzsäure hergestellt war, und Methylenblau medicinale Merck. Die Lösungen waren in bezug auf Cystein n/100, in bezug auf Methylenblau n/1000, die Wasserstoffionenkonzentration war 10^{-8} n. Sie wurden in Röhren mit eingeschliffenem Stopfen luftfrei eingefüllt und bei 25° gehalten.

Solche Lösungen, aus nicht gereinigten Komponenten hergestellt, waren in etwa 25 Minuten entfärbt. Zusatz von $^1/_{1000}$ Mol Blausäure pro Liter verlängerte die zur vollkommenen Entfärbung notwendige

Zeit auf 240 Minuten, hemmte also die Reaktion zwischen Cystein und Methylenblau sehr erheblich

Um die Ursache der Blausaurehemmung zu finden, reinigte ich das Cystein und das Methylenblau Cysteinchlorhydrat wurde aus der dreifachen Menge heißen Äthylalkohols umkristallisiert Die Hauptmenge des anhaftenden Eisens blieb hierbei in dem Alkohol Die Ausbeute an gereinigtem Chlorhydrat betrug 5% der angewandten Cysteinmenge, doch konnte das in Losung gebliebene Chlorhydrat durch Verdampfen des Alkohols nach Zusatz des gleichen Volumens Wasser zurückgewonnen und fur weitere Umkristallisationen benutzt werden

Zur Reinigung des Merckschen Methylenblaus stellte ich eine n/100 Losung her, fullte sie in ein 15 ccm fassendes Zentrifugierglas und fügte 100 mg Palladiumschwarz hinzu Dann leitete ich Wasserstoff durch die Losung, bis die Losung entfarbt war Das Leukomethylenblau fiel dabei aus und konnte mit dem Palladium von der eisenhaltigen Lösung abzentrifugiert werden Noch sechsmal wurde auf der Zentrifuge nach Sattigung mit Wasserstoff mit Wasser gewaschen Dann wurde Sauerstoff eingeleitet, wobei der Farbstoff aus dem Methylenweiß regeneriert wurde und in Losung ging Das Palladium wurde abzentrifugiert, die uberstehende Methylenblaulosung zum Versuch verwendet

Zur Neutralisation des gereinigten Cysteinchlorhydrats benutzte ich eisenfreies Ammoniak[1] Die Versuchslosungen waren, wie die ungereinigten Losungen, n/100 in bezug auf Cystein und n/1000 in bezug auf Methylenblau Die Versuchstemperatur war 25°

Es zeigte sich, daß die gereinigten Losungen viel langsamer reagierten als die ungereinigten, indem vollkommene Entfarbung der gereinigten Losungen erst nach 300 Minuten eintrat Die Zeit vollkommener Entfarbung war also durch die Reinigung auf mehr als das Zehnfache gestiegen Wurde aber Eisen (in Form von Ferrosulfat) zu den gereinigten Lösungen zugesetzt, so konnte leicht die in den ungereinigten Losungen herrschende Umsatzgeschwindigkeit oder eine noch großere hervorgebracht werden. Beispielsweise trat nach Zusatz von 10^{-5} g/Atom Eisen zu einem Liter vollkommene Entfarbung in 7 Minuten ein

[1] Sakuma, S. diese Zeitschr 142, 68 1923

Biochem. Zeitschr. 172, 432. 1926.

Über die Wirkung von Blausäureäthylester (Äthylcarbylamin) auf die Pasteursche Reaktion.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 8. April 1926.)

Wie SHIGERU TODA vor kurzem gezeigt hat[1], hemmt Blausäureäthylester ähnlich wie freie Blausäure eine Reihe von Schwermetallkatalysen, so die Oxydation des Cysteins zu Cystin in wässeriger Lösung, die Oxydation der Fructose in Phosphatlösung und die Oxydation des Leucins an Häminkohle. Die der freien Blausäure und deren Ester gemeinsame Eigenschaft, mit Schwermetallen komplexe Verbindungen zu bilden, ist die gemeinsame Ursache dieser Hemmungen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, in welcher Weise Blausäureäthylester auf chemische Vorgänge in Zellen wirkt. Sie zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Atmung.
II. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Kohlensäureassimilation.
III. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die anaerobe Gärung.
IV. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Pasteursche Reaktion.
V. Spezifische Wirkung des Blausäureäthylesters.
VI. Irreversible Hemmungen der Pasteurschen Reaktion.
VII. Wirkung der freien Blausäure auf die Pasteursche Reaktion.
VIII. Protokolle.

Für alle Versuche wurde KAHLBAUMS Äthylcarbylamin benutzt, das nach der Vorschrift von TODA von anhaftender Blausäure befreit worden war. Ich weise hier nochmals darauf hin, daß die nach GAUTIER dargestellten Blausäureester beträchtliche Mengen an freier Blausäure enthalten, und daß es nicht gelingt, die Blausäure durch fraktionierte

[1] Diese Zeitschr. 172, 17. 1926.

Destillation zu entfernen, ein Umstand, der bisher bei biologischen Versuchen mit Blausäureestern nicht beachtet wurde.

I. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Atmung.

Als Versuchsmaterial dienten Rattengewebe, und zwar Leber, Niere, Hoden, Embryo und Jensensarkom. Die Methode der Stoffwechselmessung findet man in früheren Arbeiten beschrieben[1]. Die Suspensionsflüssigkeit war Ringerlösung, die pro Liter 2 g Glucose und $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole Bicarbonat enthielt. Sie war mit 5 Vol.-Proz. Kohlensäure (in Sauerstoff) gesättigt. Die Versuchstemperatur war 37,5°, p_H etwa 7,4.

Das Ergebnis der Messungen stelle ich in der folgenden Tabelle zusammen:

(Protokolle Abschnitt VIII.)

Nr.	Gewebe	Konzentration des Blausäure-Äthylesters	Atmung Q_{O_2}	Gesamtsäurebildung $Q_S^{O_2}$	Glykolyse $Q_M^{O_2} = Q_S^{O_2} - Q_{O_2}$
1	Leber	0	10,4	10,0	0
		10^{-3} n	11,2	11,8	0,6
2	Niere	0	23,7	23,6	0
		10^{-3} n	25,7	31,7	6,0
3	Hoden	0	11,4	17,0	5,6
		10^{-3} n	11,2	19,6	8,4
4	Embryo	0	13,6	18,9	5,3
		10^{-3} n	13,6	25,8	12,2
5	Jensensarkom	0	13,2	32,2	19,0
		10^{-3} n	13,8	45,4	31,6

Betrachten wir die Atmungswerte der Tabelle, so zeigt sich, daß 10^{-3} n Blausäureester die Atmung nicht hemmt. Eher könnte man aus den angeführten Zahlen auf eine geringfügige Beschleunigung der Atmung schließen, doch liegen die beobachteten Beschleunigungen innerhalb der Grenzen der methodischen Fehler.

Freie Blausäure in 10^{-3} n Lösung hemmt unter sonst gleichen Bedingungen die Atmung der fünf untersuchten Gewebe fast vollständig[2]. Das Schwermetall des Atmungsferments reagiert also mit der freien Blausäure, nicht aber mit dem Äthylester.

Da das Schwermetall der von Toda untersuchten Modelle sowohl mit der freien Blausäure als auch mit dem Äthylester in 10^{-3} n Lösung reagiert, so ist zu schließen, daß sich das Schwermetall des Atmungsferments nach Natur oder Bindung von dem Schwermetall der Modelle unterscheidet.

---

[1] Diese Zeitschr. **142**, 51. 1924, **164**, 481. 1925.

[2] Vgl. diese Zeitschr. **152**, 309. 1924, sowie Protokoll 2 dieser Arbeit.

Was die erste Möglichkeit anbetrifft, so könnte man an Mangan denken. Dazu würde stimmen, daß die katalytische Oxydation des Cysteins durch Mangan, wie ich beobachtet habe, von 10^{-3} n Blausäureäthylester nicht gehemmt wird. Doch wird die Mangankatalyse im Gegensatz zur Zellatmung durch freie Blausäure nur wenig gehemmt. Während man also auf der einen Seite durch die Manganhypothese eine Schwierigkeit aus dem Wege schafft, tritt auf der anderen Seite eine neue Schwierigkeit auf.

Viel wahrscheinlicher ist die zweite Möglichkeit, daß die verschiedene Reaktionsfähigkeit gegenüber Blausäureäthylester durch verschiedene Bindung desselben Metalls, nämlich des Eisens, bedingt ist, Verschiedenheiten, die man sich durch Begleitstoffe hervorgerufen oder elementarer vorstellen mag. Daß es Eisenverbindungen gibt, die mit der freien Blausäure, nicht aber mit dem Blausäureester reagieren, läßt sich leicht zeigen. Methämoglobin reagiert unter Umschlag der Farbe von braun in kirschrot mit freier Blausäure[1], nicht jedoch, wie ich beobachtet habe, mit dem Blausäureäthylester.

II. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Kohlensäureassimilation.

Ich habe die Kohlensäureassimilation von Chlorella in 10^{-3} n Blausäureäthylester gemessen, und zwar unter Bedingungen, unter denen die Blackmansche Reaktion die Geschwindigkeit der Assimilation bestimmt. Unter solchen Bedingungen hemmt eine 10^{-3} n Lösung von freier Blausäure[2] die Assimilation um 95%. Eine Wirkung des Blausäureäthylesters habe ich nicht beobachtet. Die photochemisch entwickelten Sauerstoffmengen in 10^{-3} n Blausäureäthylester waren ebenso groß wie in der esterfreien Kontrolle. Der Katalysator der Blackmanschen Reaktion verhält sich also ähnlich wie das Atmungsferment, er reagiert mit der freien Blausäure, aber nicht mit dem Ester.

III. Die Wirkung des Blausäureäthylesters auf die anaerobe Gärung.

Ich habe die Gärung von Hefezellen und von Tumorzellen in 10^{-3} n Blausäureäthylester unter anaeroben Bedingungen gemessen und keinen Einfluß auf die Gärung gefunden. Beispielsweise war für die Schnitte eines Jensensarkoms (Protokoll 6)

	$Q_M^{N_2}$
Ohne Blausäureester . . .	26.2
In 10^{-3} n Blausäureester .	26.2

[1] Kobert, R.: Über Cyanmethämoglobin. Stuttgart, F. Enke, 1891.
[2] Diese Zeitschr. **146**, 488. 1924.

Freie Blausaure wirkt in 10^{-3} n Lösung nach fruheren Versuchen auf die anaerobe Garung von Tumorzellen[1] gar nicht, auf die anaerobe Gärung von Hefezellen[2] nur sehr wenig

IV. Wirkung des Blausäureäthylesters auf die Pasteursche Reaktion.

Betrachtet man in der Tabelle des Abschnitts I die fur die aerobe Milchsaurebildung gefundenen Werte, so fällt auf, daß sie unter dem Einfluß von 10^{-3} n Blausaureester durchweg höher als die Normalwerte sind Die aerobe Milchsaurebildung in 10^{-3} n Blausäureester scheint fast so groß zu sein wie die anaerobe Milchsaurebildung

In welchem Maße das zutrifft, läßt sich aus methodischen Gründen am besten prufen, wenn wir als Versuchsobjekt das stark garende Tumorgewebe wahlen Fur Schnitte von Jensensarkomen bestimmte ich die anaerobe Milchsauregarung, die aerobe Milchsauregarung, beide unter Normalverhaltnissen, und außerdem die aerobe Milchsauregärung in 10^{-3} n Blausaureester, und fand (Protokoll 7)

Anaerobe Garung	Aerobe Garung	Aerobe Garung in 10^{-3} n Blausaureester
ohne Blausaureester		
$Q_M^{N_2} = 27{,}6$	$Q_M^{O_2} = 14{,}6$	$Q_M^{O_2} = 28{,}4$

also in der Tat die aerobe Garung in 10^{-3} n Blausaureester ebenso groß wie die normale anaerobe Garung Wurde der Schnitt aus der esterhaltigen Losung in esterfreie Lösung ubergefuhrt, so sank die aerobe Garung auf fast den Normalwert, namlich von 28,4 auf 16 (Protokoll 7) Es zeigte sich also, daß die Wirkung des Blausaureesters reversibel war.

Da 10^{-3} n Blausäureester weder die Atmung noch die anaerobe Gärung beeinflußt, wie in den vorhergehenden Abschnitten erörtert, so liegt offenbar eine elektive Wirkung auf die Reaktion vor, die Atmung und Garung verbindet

Bekanntlich fand Pasteur[3], daß die Atmung die Garung „hemmt“ Brachte er Zellen, die unter anaeroben Bedingungen garten, in Sauerstoff, so bewirkte die nun einsetzende Atmung, daß die Gärung kleiner wurde bzw. verschwand. Atmung und Garung sind also durch eine chemische Reaktion verbunden, die ich nach ihrem Entdecker „Pasteursche Reaktion“ nenne.

Charakteristisch fur die Pasteursche Reaktion ist weniger die

[1] Diese Zeitschr. **152**, 309. 1924. [2] Ebendaselbst **165**, 196. 1925.
[3] Bulletin de la Société chimique de Paris, 28. Juni 1861, S. 79 bis 80.

Gärungshemmung selbst als das Verhältnis der Gärungshemmung zur Atmung, der Quotient[1]

$$\frac{\text{anaerobe Gärung} - \text{aerobe Gärung}}{\text{Atmung}}.$$

Dieser Quotient, den zuerst O. Meyerhof für den Muskel gemessen hat, ist eine rein experimentelle Größe, unabhängig von jeder Theorie und insbesondere unabhängig davon, ob die Pasteursche Reaktion die Gärungsprodukte am Entstehen verhindert oder — im Sinne der Meyerhofschen Theorie — in einem inneren Kreislauf zum Verschwinden bringt.

Das Ergebnis dieses Abschnitts läßt sich kurz dahin zusammenfassen, daß Blausäureäthylester elektiv die Pasteursche Reaktion hemmt. 10^{-3} n Blausäureester unterbricht die zwischen Atmung und Gärung bestehende Koppelung, der Meyerhofquotient wird Null.

V. Spezifische Wirkung des Blausäureäthylesters.

Findet man, daß eine Substanz einen chemischen Vorgang in der Zelle hemmt, so ist die erste Frage, ob es sich um eine unspezifische Oberflächenwirkung (Narkose) oder um eine spezifische chemische Wirkung handelt.

Daß 10^{-3} n Blausäureäthylester nicht narkotisch wirkt, geht mit großer Wahrscheinlichkeit aus der oben mitgeteilten Tatsache hervor, daß der Ester in dieser Konzentration ohne Wirkung auf die Kohlensäureassimilation ist. Denn von allen Lebensvorgängen ist die Kohlensäureassimilation gegenüber narkotisch wirkenden Substanzen der empfindlichste[2].

Zur Entscheidung der Frage ließ ich ein Narkoticum, das stärker adsorbiert wird als Blausäureäthylester, auf gärende Tumorzellen in 10^{-3} n Lösung einwirken. Ich wählte Valeronitril[3], dessen Adsorption von Toda[4] mit der Adsorption des Blausäureäthylesters verglichen und stärker gefunden worden war, und fand für Schnitte des Jensensarkoms:

Ohne Valeronitril	In 10^{-3} n Valeronitril
$Q_M^{O_2} = 14{,}4$ $Q_M^{N_2} = 25{,}8$	$Q_M^{O_2} = 16{,}2$ $Q_M^{N_2} = 26{,}8$

also keine Unterbrechung der Pasteurschen Reaktion, sondern — innerhalb der Fehlergrenzen — in 10^{-3} n Valeronitril die gleiche Wirkung

---

[1] Diese Zeitschr. 152, 309, 1924. [2] Ebendaselbst 100, 230, 1919.

[3] $(CH_3)_2CHCH_2CN$. Diese Substanz war nach Todas Vorschrift sowohl von Isonitril als auch von Blausäure befreit worden.

[4] Diese Zeitschr. 172, 17, 1926.

der Atmung auf die Garung, wie ohne Valeronitril Der Versuch beweist, daß die Wirkung des Blausaureathylesters, die in 10^{-3} n Lösung auftritt, keine narkotische, sondern eine spezifisch-chemische ist.

Da Toda antikatalytische Wirkungen des Blausaureathylesters in 10^{-3} n Losung kunstlich erzeugen konnte, indem er den Ester auf Schwermetallkatalysen einwirken ließ, und andere antikatalytische Wirkungen des Blausaureesters nicht bekannt sind, so nehme ich an, daß die Pasteursche Reaktion eine Schwermetallkatalyse ist Indem der Blausaureathylester mit dem Metall zu einer komplexen Verbindung zusammentritt, inaktiviert er das Metall und unterbricht so die Koppelung zwischen Atmung und Garung

Ich erwähne noch, daß man ahnliche, wenn auch nicht so schlagende Versuche anstellen kann, wenn man statt Tumorzellen Hefezellen als Versuchsmaterial benutzt Ohne daß die Atmung der Hefe wesentlich gehemmt wird, steigt in 10^{-3} n Blausaureathylester die aerobe Garung an Doch erreicht die aerobe Hefegarung in 10^{-3} n Blausaureester nicht die Hohe der anaeroben Garung.

VI. Irreversible Unterbrechung der Pasteurschen Reaktion.

Neben der spezifischen Hemmung der Pasteurschen Reaktion durch Blausaureester gibt es unspezifische Hemmungen, beispielsweise durch Narkotica, doch sind die Erscheinungen hier weniger einfach, da man so hohe Narkoticumkonzentrationen anwenden muß, daß gleichzeitig die Atmung gehemmt wird Vielfach findet man dann, daß mit der Atmung der Meyerhofquotient sinkt, also außer der Atmung die Pasteursche Reaktion gehemmt wird Diese Hemmungen sind nur unvollkommen reversibel

Hemmungen der Pasteurschen Reaktion treten auch auf[1], wenn man empfindliche Gewebe wie Hoden oder Rattenembryonen schadigt, indem man sie in Ringerlosung, anstatt in Serum halt Das erste chemische Zeichen einer Schadigung ist — bei ungehemmter Atmung und ungehemmter anaerober Garung — eine Zunahme der aeroben Garung, d h partielle Unterbrechung der Pasteurschen Reaktion Diese Hemmungen sind vollig irreversibel und wie alle irreversiblen Hemmungen nicht von besonderem Interesse, da sie nicht einfach zu deuten sind

VII. Wirkung der freien Blausäure auf die Pasteursche Reaktion.

Die Moglichkeit, mit Blausaureathylester die Pasteursche Reaktion elektiv und spezifisch zu hemmen, beruht auf zwei Eigenschaften dieser

[1] Diese Zeitschr. **152**, 309. 1924, **165**, 122 1925 Die erste derartige irreversible Hemmung fand O. Meyerhof beim Zerschneiden des Muskels Vgl. Arch f. d ges. Physiologie **188**, 114 1921.

Substanz ihrer Fähigkeit, mit Schwermetallen komplexe Verbindungen zu bilden, und ihrer Unfähigkeit, mit dem Schwermetall des Atmungsferments zu reagieren. Von beiden Eigenschaften besitzt die freie Blausäure die erste, nicht aber die zweite Gegen freie Blausäure ist das Atmungsferment empfindlicher als der Katalysator der Pasteurschen Reaktion. Deshalb kann man mit freier Blausäure Wirkungen, wie sie der Blausäureäthylester hervorbringt, nicht erzielen

VIII. Protokolle.

1 Stoffwechsel der Leber.

1. Normalversuch. 2. In 10^{-3} n Äthylcarbylamin.

5 · · CO_2—O_2	5 · CO_2—O_2
v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,69
K_{O_2} 0,557 K_{CO_2} 0,918	k_{O_2} 0,95 k_{CO_2} 1,10
18,99 mg	17,26 mg
Ohne Carbylamin	Ohne Carbilamin
H	h
20′ — 49,0	20′ · — 10,5
In 10^{-3} n Carbylamin	In 10^{-3} n Carbylamin
H	h
20′ — 47,0	20′ — 6,0

Daraus folgt	Q_{O_2}	$Q_S^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Ohne Carbylamin	10,4	10,0	0
In 10^{-3} n Carbylamin	11,2	11,8	0,6

2. Stoffwechsel der Niere

1. Normalversuch. 2. In 10^{-3} n HCN 3 In 10^{-3} n Äthylkarbylamin.

5 CO_2—O_2	5 CO_2—O_2
v_F 8 v_G 5,83	v_F 3 v_G 11,2
K_{O_2} 0,532 K_{CO_2} 0,945	k_{O_2} 0,995 k_{CO_2} 1,15
6,24 mg	6,03 mg
Normalversuch	Normalversuch
H	h
20′ — 41,5	20′ — 7,0
In 10^{-3} n HCN	In 10^{-3} n HCN
H	h
20′ + 4,0	20′ — 5,5
In 10^{-3} n Carbylamin	In 10^{-3} n Carbylamin
v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,69
K_{O_2} 0,557 K_{CO_2} 0,918	k_{O_2} 0,95 k_{CO_2} 1,10
7,33 mg	6,02 mg
H	h
30′ · — 42	30′: + 5,5

Daraus folgt	Q_{O_2}	$Q_S^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Normalversuch . .	23,7	23,6	0
In 10^{-3} n HCN	2,0	5,9	3,9
In 10^{-3} n Carbylamin .	25,7	31,7	6,0

3. Stoffwechsel des Hodens

1. Normalversuch. 2 In 10^{-3} n Carbylamin.

5 % CO_2—O_2 v_F 8 v_G 5,83 K_{O_2} 0.532 K_{CO_2} 0,945 4,89 mg	5 % CO_2—O_2 v_F 3 v_G 11,23 k_{O_2} 0,995 k_{CO_2} 1,15 4,08 mg
Normalversuch H 45′: — 13,0	Normalversuch h 45′: + 10,0
In 10^{-3} n Carbylamin H 60′. — 1	In 10^{-3} n Carbylamin h 60′: + 24,0

Daraus folgt:	Q_{O_2}	$Q_S^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Normalversuch . . .	11,4	17,0	5,6
In 10^{-3} n Carbylamin . .	11,2	19,6	8,4

4. Stoffwechsel des Embryos.

1. Normalversuch. 2. In 10^{-3} n Äthylcarbylamin.

5 % CO_2—O_2 v_F 8 v_G 5,51 K_{O_2} 0,50 K_{CO_2} 0,92 3 Embryonen zusammen 12,5 mg	5 % CO_2—O_2 v_F 3 v_G 10,54 k_{O_2} 0,93 k_{CO_2} 1,09 3 Embryonen zusammen 9,76 mg
Normalversuch H 30′. — 41,0	Normalversuch h 30′: — 13,5
In 10^{-3} n Carbylamin H 30′ — 17,5	In 10^{-3} n Carbylamin h 30′: + 29,5

Daraus folgt:	Q_{O_2}	$Q_S^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Normalversuch .	13,6	18,9	5,3
In 10^{-3} n Carbylamin . .	13,6	25,8	12,2

5 Stoffwechsel des Jensensarkoms.

5 % CO_2—O_2 v_F 7 v_G 6,16 K_{O_2} 0,557 K_{CO_2} 0,918 4,81 mg	5 % CO_2—O_2 v_F 3 v_G 10,69 k_{O_2} 0,95 k_{CO_2} 1,10 4,00 mg
Normalversuch H 30′: + 27,0	Normalversuch h 30′· + 30,5
In 10^{-3} n Carbylamin 30′: + 58,5	In 10^{-3} n Carbylamin 30′: + 53,0

Daraus folgt:	Q_{O_2}	$Q_S^{O_2}$	$Q_M^{O_2}$
Normalversuch .	13,2	32,2	19
In 10^{-3} n Carbylamin . .	13,8	45,4	31,6

6. Anaerobe Gärung des Jensensarkoms.

5 % CO_2—N_2 v_F 3 v_G 11,2 k_{CO_2} 1,14 4,15 mg
Normalversuch h 20': + 31,5
In 10^{-3} n Äthylcarbyl- amin h 20': + 31,5

Daraus folgt:	$Q_M^{N_2}$
Normalversuch . . .	26,2
In 10^{-3} n Carbylamin . .	26,2

7. Aerobe und anaerobe Gärung des Jensensarkoms im Blausäureäthylester.

Zur Messung der aeroben Gärung des Jensensarkoms benutzt man zwei Gefäße mit variiertem v_F wie in dem Versuch des Protokolls 5, oder einfacher, wenn die Größenordnung der Atmung bekannt ist, ein Gefäß mit kleinem v_F. Ist nämlich die Gärung groß und v_F im Vergleich zu v_G klein, so hat der durch die Atmung erzeugte Druck (der immer negativ ist) nur die Bedeutung eines Korrektionsgliedes. Das Korrektionsglied für eine Versuchszeit von einer Stunde ist

$$h' = \left(-\frac{Q_{O_2}}{k_{O_2}} + \frac{Q_{O_2}}{k_{CO_2}}\right) \times \text{Gewebegewicht} \qquad (1)$$

h' ist klein, weil bei kleinem v_F die Gefäßkonstanten k_{O_2} und k_{CO_2} nahezu gleich sind.

Beträgt der beobachtete Druck in t Stunden h mm, so ist der korrigierte Druck

$$h - h' \cdot t$$

und die aerobe Gärung

$$Q_M^{O_2} = \frac{(h - h' \cdot t) \times k_{CO_2}}{t \times \text{Gewebegewicht}} \qquad (2)$$

Nach dieser Formel sind die $Q_M^{O_2}$-Werte dieses Protokolls berechnet, wobei in Gleichung (1) $Q_{O_2} = 10$ gesetzt wurde.

5 % CO_2—O_2	5 % CO_2—O_2	5 % CO_2—N_2
v_F 3 v_G 10,64	v_F 3 v_G 10,51	v_F 3 v_G 9,95
k_{O_2} 0,95 k_{CO_2} 1,10	k_{O_2} 0,93 k_{CO_2} 1,09	k_{CO_2} 1,04
4,08 mg	4,19 mg	4,20 mg
Ohne Carbylamin	In 10^{-3} n Carbylamin	Ohne Carbylamin
Beobachteter Druck	Beobachteter Druck	Beobachteter Druck
15′ + 12	15′ + 26	15′ + 28,5
15′ + 12	15′ + 25	15′ + 27,0
30′ + 24	30′ + 51	30′ + 55,5
$h' \cdot t$ — 2,9	$h' \cdot t$ — 3,4	
Korrig. Druck: + 26,9	Korrig. Druck: + 54,4	
$Q_M^{O_2}$: 14,6	$Q_M^{O_2}$: + 28,4	$Q_M^{N_2}$: + 27,5
	Nach Auswaschen des Carbylamins	
	15′ + 14	
	15′ + 13,5	
	30′ + 27,5	
	$h' \cdot t$ — 3,4	
	Korrig. Druck: + 30,9	
	$Q_M^{O_2}$: + 16,2	

8. Aerobe und anaerobe Garung des Jensensarkoms in Valeronitril.

Die Anordnung war dieselbe wie in dem Versuch des Protokolls 7.

Ohne Valeronitril		10^{-3} n Valeronitril	
5 % CO_2—O_2	5 % CO_2—N_2	5 % CO_2—O_2	5 % CO_2—N_2
v_F 3 v_G 10,6	v_F 3 v_G 10,54	v_F 3 v_G 10,70	v_F 3 v_G 10,51
k_{O_2} 0,90 k_{CO_2} 1,10	k_{CO_2} 1,09	k_{O_2} 0,95 k_{CO_2} 1,10	k_{CO_2} 1,09
4,39 mg	4,82 mg	4,93 mg	4,48 mg
Beobacht. Druck	Beobacht. Druck	Beobacht. Druck	Beobacht. Druck
15′: + 12,0	15′: + 29,5	15′. + 15,5	15′ + 27,5
15′: + 13,5	15′ + 27,5	15′ + 17,0	15′: + 27,5
15′: + 13,0	15′ + 28,5	15′ + 16,5	15′ + 27,5
45′: + 38,5	45′ + 85,5	45′ + 49,0	45′ + 82,5
$h' t$ — 4,7		$h' t$: — 5,3	
Korr. Druck: + 43,2		Korr. Druck: + 54,3	
$Q_M^{O_2}$: 14,4	$Q_M^{N_2}$: 25,8	$Q_M^{O_2}$: 16,2	$Q_M^{N_2}$ 26,8

Biochem Zeitschr 174, 497. 1926

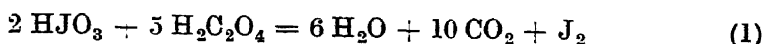
Zusatz beim Neudruck:
Exempla docent, vestigia terrent.

Über die Oxydation der Oxalsäure durch Jodsäure.

Von
Otto Warburg (Berlin-Dahlem).

(Eingegangen am 23. Juni 1926.)

Wasserige Jodsaure-Oxalsaurelösungen reagieren bei Zimmertemperatur nach der Gleichung:

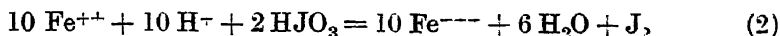
$$2\,HJO_3 + 5\,H_2C_2O_4 = 6\,H_2O + 10\,CO_2 + J_2 \qquad (1)$$

MILLON fand[1], daß das ausgeschiedene Jod die Reaktion beschleunigt und daß Blausaure die Reaktion antikatalytisch hemmt

Zur Erklarung der Blausaurewirkung nahm MILLON an, daß zwei ihrem Mechanismus nach verschiedene Reaktionen vorliegen Die erste Reaktion ist eine direkte zwischen Jodsaure und Oxalsaure und verlauft sehr langsam Die zweite schnellere Reaktion ist die durch Jod katalysierte Indem Blausaure das in der ersten Reaktion gebildete Jod unter Bildung von Jodcyan wegfangt, hemmt sie die zweite Reaktion und laßt nur die sehr langsame erste Reaktion ubrig

SHIGERU TODA[2] hat sich in Dahlem naher mit der Reaktion beschaftigt Er fand, daß die Reaktionsgeschwindigkeit auf den zehnten Teil sank wenn er die beiden Sauren sorgfaltig reinigte Zusatz von 10^{-5} mg Eisen (als Ferrosulfat) zu 4 ccm eines 1/2 normalen gereinigten Sauregemisches bewirkte eine eben meßbare Beschleunigung der Reaktion, Zusatz von 10^{-3} mg Eisen beschleunigte auf das Zehnfache und brachte damit die Reaktionsgeschwindigkeit der gereinigten Losungen wieder auf die Geschwindigkeit der ungereinigten Losungen Blausaure brachte die Wirkung des zugesetzten Eisens vollkommen zum Verschwinden Aus TODAs Versuchen schloß ich daß die Reaktion zwischen Jodsaure und Oxalsaure durch Eisen beschleunigt wird und daß Blausaure den Umsatz hemmt, indem sie sich mit dem Eisen verbindet

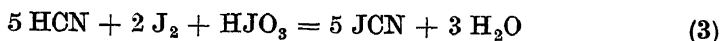
Dieser Schluß war unrichtig Ferrosalze werden von Jodsaure zu Ferrisalzen oxydiert, wobei aus der Jodsaure freies Jod entsteht Die Bilanzgleichung ist

$$10\,Fe^{++} + 10\,H^{+} + 2\,HJO_3 = 10\,Fe^{+++} + 6\,H_2O + J_2 \qquad (2)$$

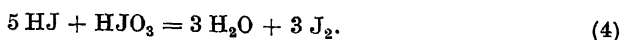
---

[1] MILLON, E. Ann. de Chim. et de Phys. (3) 13, 29. 1845

[2] TODA, S., diese Zeitschr. 171, 231 1926; vgl. auch H WIELAND u. F. G FISCHER. Chem Ber. 59, 1171. 1926.

Die von TODA beobachteten Erscheinungen kann man nun durch die Annahme erklaren, daß das Ferrosulfat die Jodsaure-Oxalsaurereaktion durch Jodabscheidung beschleunigt, und daß Blausaure die Wirkung des Eisens zum Verschwinden bringt, indem sie nach MILLON das Jod unter Bildung von Jodcyan aus der Losung entfernt.

$$5\,HCN + 2\,J_2 + HJO_3 = 5\,JCN + 3\,H_2O \quad (3)$$

Zur Prufung dieser Annahme war es notwendig, Jodsaure-Oxalsäuregemischen Ferrosulfat zuzusetzen und in einem Parallelversuch diejenige Menge Jod, die nach Gleichung (2) dem zugesetzten Eisen aquivalent war. Dann mußten beide Zusätze die gleichen Beschleunigungen der Jodsaure-Oxalsaurereaktion hervorbringen

Versuch Das Eisen wurde als Ferrosulfat zugesetzt, und zwar in schwefelsaurer Losung, um die Hydrolyse und damit die Autoxydation des Eisens zu verhindern. Das Jod wurde als Jodwasserstoff zugesetzt, der sich beim Zusammentreffen mit Jodsaure nach der Gleichung umsetzte

$$5\,HJ + HJO_3 = 3\,H_2O + 3\,J_2. \quad (4)$$

Da die Jodsaure-Oxalsäure-Reaktion, wie schon MILLON beobachtete, lichtempfindlich ist, so wurde, um Komplikationen durch Photokatalyse zu vermeiden, im Dunkeln gearbeitet und auch die Mischung der Jodsaure mit der Oxalsaure im Dunkeln vorgenommen. Um ferner die Losungen so frei als moglich von Anfangsjod zu haben, begannen die Messungen so bald als moglich nach dem Mischen der Sauren Die Messungen geschahen manometrisch, durch Bestimmung der nach Gleichung (1) entwickelten Kohlensaure

In drei mit Ansatzbirnen versehene Gefaße brachte ich je 2 ccm eines Jodsaure-Oxalsauregemisches, das in bezug auf beide Sauren n/2 war Beide Sauren waren KAHLBAUMsche Praparate und nicht besonders gereinigt In die Birnen der Gefaße wurde eingefullt

In die Birne des Gefaßes I: 0,2 ccm n/100 H_2SO_4,
„ „ „ „ „ II 0,2 „ n/100 H_2SO_4, n/1000 $FeSO_4$
„ „ „ „ „ III 0,2 „ n/100 H_2SO_4, n/5000 KJ

Die Gefaße wurden, mit ihren Manometern verbunden, in einen auf 18° einstehenden Wasserthermostaten gehangt und zwecks Druck- und Temperaturausgleich geschuttelt 10 Minuten nach dem Mischen der Sauren wurde der Inhalt der Birnen quantitativ in das Sauregemisch ubergespult Die entwickelten Kohlensauremengen 20 Minuten nach Zugabe des Birneninhalts waren:

Gefaß I cmm CO_2	Gefaß II cmm CO_2	Gefaß III cmm CO_2
1,3	8,8	7,8

Es zeigte sich also, daß sowohl das Ferrosulfat als auch das Jod die Reaktion beschleunigten, und zwar in ungefahr demselben Maße. Dies beweist, daß die oben geaußerte Annahme zutrifft Eisen beschleunigt die Jodsaure-Oxalsaure-Reaktion durch Jodabscheidung.

Überraschend hierbei ist, wie klein die katalytisch wirksamen Jodmengen sind. In dem angeführten Versuch, bei Verwendung ungereinigter Säuren, beschleunigte $2{,}4 \cdot 10^{-5}$ n Jod auf das Sechsfache. Bei Verwendung gereinigter Lösungen fand TODA eine Beschleunigung, wenn er 10^{-5} mg Fe^{II} zu 4 ccm Säuregemisch zusetzte. Die Eisenkonzentration war dann $5 \cdot 10^{-8}$ n, die Jodkonzentration, nach Gleichung (2) berechnet, 10^{-8} n.

TODA reinigte die Jodsäure und die Oxalsäure mit der Absicht, Schwermetalle zu entfernen. Wahrscheinlich war bei der Reinigung der Oxalsäure das Entscheidende die Entfernung von Ferrooxalat, das beim Zusammenbringen mit Jodsäure die Abscheidung von Jod veranlassen muß. Bei der Reinigung der Jodsäure dagegen kann, da zweiwertiges Eisen in Jodsäure nicht vorkommt, die Entfernung von Eisenspuren nicht von Einfluß gewesen sein, sondern hier war es offenbar die Entfernung von Jodspuren. In käuflicher Jodsäure findet man immer Kristalle, die infolge von Jodbeimengungen bräunlich schimmern.

Nach dem Gesagten ist die Jodsäure-Oxalsäurereaktion und ihre Hemmung durch Blausäure aus der Reihe der für die Biologie wichtigen Modellreaktionen zu streichen.

Biochem. Zeitschr. **177**, 471. 1926.

Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe.

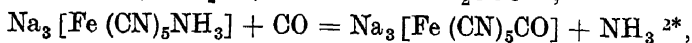
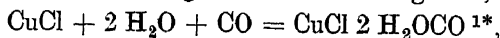
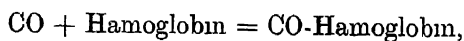
Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem)

(Eingegangen am 24. August 1926.)

Mit 5 Abbildungen.

Da Kohlenoxyd bei niedriger Temperatur mit Schwermetallverbindungen reagiert, z. B.

$$CO + \text{Hämoglobin} = \text{CO-Hämoglobin},$$
$$CuCl + 2\,H_2O + CO = CuCl\,2\,H_2OCO\ ^{1*},$$
$$Na_3\,[Fe\,(CN)_5NH_3] + CO = Na_3\,[Fe\,(CN)_5CO] + NH_3\ ^{2*},$$

so lag es nahe, zu untersuchen, ob Kohlenoxyd die Zellatmung hemmt.

Als Versuchsmaterial benutzte ich Bäckerhefe, suspendiert in glucosehaltiger, saurer Phosphatlösung ($m/20\ KHPO_4$, $m/18$ Glucose). Das Kohlenoxyd entwickelte ich durch Eintropfen von Ameisensäure in erwärmte konzentrierte Schwefelsäure und reinigte es durch Waschen mit starker Kalilauge. Es wurde in einem graduierten Quecksilbergasometer aufgefangen und hier mit Sauerstoff oder mit Sauerstoff und Stickstoff gemischt. Die genaue Zusammensetzung des Gasgemisches bestimmte ich gasanalytisch nach HALDANE.

Ich teile die Versuche in folgenden Abschnitten mit:

I. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung.
II. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung.
III. Gärung in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen.
IV. Wirkung des Lichtes.
V. Einfluß der Wellenlänge des Lichtes.
VI. Zusammenfassung.
VII. Protokolle.

I. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung.

Zur Messung der Atmung benutzte ich Gefäße nach Abb. 1. Der Rauminhalt betrug etwa 15 ccm. In den Hauptraum *H* füllte ich 2 ccm

---

1* MANCHOT, W.: Chem. Ber. **53**, 984.

2* DERSELBE: ebendaselbst **45**, 2869. 1912. — MANCHOT, W. u. WORINGER: ebendaselbst **46**, 3514. 1913.

einer Hefesuspension, die einige Milligramm Hefe enthielt, in den Einsatz E und die Birne B 5proz. Kalilauge zur Absorption der Atmungs- und Gärungskohlensäure. Waren die Gefäße durch Schliff mit ihren Manometern verbunden, so wurden die Gasräume mit Gasmischungen verschiedener Zusammensetzung gefüllt. Dann wurde bei 20 oder 37,5° im Wasserthermostaten geschüttelt. In jedem Falle überzeugte ich mich durch Variation der Schüttelgeschwindigkeit, daß die Manometerausschläge unabhängig von der Schüttelgeschwindigkeit waren, eine notwendige und leicht auszuführende Kontrolle. Aus den Manometerausschlägen h wurde der verbrauchte Sauerstoff x_{O_2} nach der Gleichung

$$x_{O_2} = hK_{O_2}$$

berechnet, wo K_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff bedeutet. Zur Orientierung über die Größe des Hefestoffwechsels diene die Angabe, daß 1 mg Hefe (Trockensubstanz) bei 20° und in glucosehaltiger Phosphatlösung unter Normalverhältnissen pro Stunde 50 bis 100 cmm Sauerstoff verbraucht und anaerob etwa das doppelte Volumen an Gärungskohlensäure entwickelt.

H

E

Abb. 1

Der Gesamtdruck bei allen Versuchen war gleich dem Barometerstand. Je höher also der Kohlenoxyddruck, um so niedriger war der Sauerstoffdruck in den Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen, und zwar lag der Sauerstoffdruck zwischen 165 und 31 mm Hg. Innerhalb dieses Druckintervalls nimmt die Atmung der Hefe mit sinkendem Sauerstoffdruck ein wenig ab, um so mehr, wie es schien, je höher die Temperatur. Die Ursache dieser Abnahme zu ermitteln, wäre ein interessantes Thema. Für diese Arbeit bedeutete die Änderung der Atmung mit dem Sauerstoffdruck eine unerwünschte Komplikation. Sie wurde eliminiert, indem Kohlenoxydversuch und Kontrollversuch bei gleichen Sauerstoffdrucken ausgeführt wurden.

Die Versuchszeit betrug 30 bis 60 Minuten. Als Maß der Kohlenoxydwirkung diente die prozentische Atmungshemmung

$$\frac{A_0 - A}{A_0},$$

wo A_0 die Atmung ohne Kohlenoxyd und A die Atmung bei Gegenwart von Kohlenoxyd bedeutet.

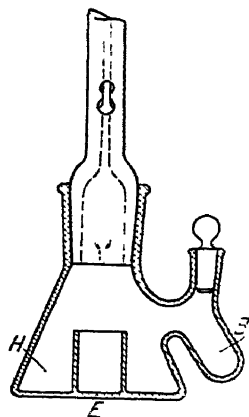
Tabelle 1 enthält das Ergebnis der Messungen. Die Versuche 1 und 5 der Tabelle sind durch die Protokolle 1 und 2 (Abschnitt VII) ausführlich beschrieben. Tabelle 1 zeigt, daß Kohlenoxyd die Atmung der Hefe

hemmt, und zwar, je nach der Zusammensetzung des Gasgemisches, in den angeführten Versuchen um 22 bis 77% Wichtig ist dabei, daß es nicht nur auf den Kohlenoxyddruck, sondern auch auf den Sauerstoffdruck ankommt. Beispielsweise betrug die Atmungshemmung bei einem Kohlenoxyddruck von 583 mm 24 oder 72%, je nachdem der gleichzeitig herrschende Sauerstoffdruck hoch oder niedrig war. Wichtig ist ferner, daß die Hemmungen durch Kohlenoxyd vollständig reversibel sind (vgl. Protokoll 1). Mit Kohlenoxyd behandelte Hefe, in kohlenoxydfreies Gas zurückgebracht, atmete nicht schwächer, sondern eher ein wenig stärker als die Kontrollhefe

Tabelle 1 *Atmung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen*

Nr.	Temperatur	Gasmischung in Vol.-%		Gasdrucke in mm Hg		Hemmung der Atmung
	°C	CO	O_2	CO	O_2	%
1	20	80,1	19,9	590	146	35
		88,6	11,4	650	84	61
2	37,5	80,7	19,3	568	136	38
		87,7	12,3	615	87	60
3	37,5	78	22	550	155	22
		90,6	9,4	638	66	55
4	20	78,8	21,2	582	157	24
		79,0	4,4	585	32,5	72
5	37,5	76,8	23,2	540	164	34
		74,7	5,3	525	37,3	77
6	37,5	80	20	570	142	36
		80	4,4	570	31,3	74

Bezeichnen wir im folgenden den sauerstoffübertragenden Bestandteil des Atmungsferments kurz als „Atmungsferment", so folgt aus den mitgeteilten Versuchen, daß sich das Atmungsferment mit Kohlenoxyd verbindet und in dem Fermentmolekül diejenige Stelle besetzt, die normalerweise mit Sauerstoff reagiert. Hierdurch wird die sauerstoffübertragende Tätigkeit des Ferments gehemmt.

Ähnlich wie Hämoglobin reagiert also das Atmungsferment sowohl mit Kohlenoxyd als auch mit Sauerstoff. Abweichend von Hämoglobin bindet das Atmungsferment Sauerstoff fester als Kohlenoxyd. Deshalb kann man zwar aus Hämoglobin den Sauerstoff durch kleine Kohlenoxyddrucke austreiben, aber es bedarf relativ großer Kohlenoxyddrucke, um die Atmung durch Kohlenoxyd zu hemmen.

Für die Verteilung des Hämoglobins zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff gilt angenähert die Gleichung

$$\frac{HbO_2}{HbCO} \frac{p_{CO}}{p_{O_2}} \frac{\alpha_{CO}}{\alpha_{O_2}} = \text{konst}.$$

Analog könnte man daran denken, daß der Ausdruck

$$\frac{\alpha}{1-\alpha}\,\frac{p_{CO}}{p_{O_2}}\,\frac{\alpha_{CO}}{\alpha_{O_2}}$$

konstant sei, wo $\alpha = \frac{A}{A_0}$ ist. Wie es scheint und man nach Tabelle I kontrollieren mag, ist dieser Ausdruck nicht konstant, sondern wird mit steigenden Kohlenoxyddrucken kleiner. Dies bedeutet, daß die Atmungshemmungen mit steigenden Kohlenoxyddrucken stärker zunehmen, als die Formel verlangt.

Die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung der Hefe ist schwächer als die Wirkung der Blausäure. Blausäure hemmt die Atmung der gleichen Heferasse — in saurer, glucosehaltiger Phosphatlösung — fast vollständig bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol./Liter, während die hier angewandten Kohlenoxydkonzentrationen, die nur unvollständig hemmen, von der Größenordnung 10^{-3} Mol./Liter sind.

Neben der Bäckerhefe habe ich auch Bierhefe als Versuchsmaterial benutzt, sowie einen aus Luft gezüchteten Kokkus („Mikrococcus candicans" des Berliner Hygienischen Instituts) und rote Blutzellen der Gans. Bierhefe und Kokkus verhielten sich gegen Kohlenoxyd wie Bäckerhefe. Dagegen wurde die Atmung der roten Vogelblutzellen nur wenig durch Kohlenoxyd gehemmt. Ich bemerke noch, daß Gewebsschnitte für Kohlenoxydversuche ungeeignet sind, weil man die Schnitte nicht so dünn herstellen kann, wie es der niedrige Sauerstoffdruck, bei dem man arbeiten muß, verlangt.

II. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung.

Um die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung der Hefe zu untersuchen, verglich ich die Gärung in Stickstoff mit der Gärung in Kohlenoxyd. Hierbei bemühte ich mich, den Sauerstoffdruck so tief als möglich herabzudrücken, weil nach den oben mitgeteilten Erfahrungen an eine Konkurrenz zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd zu denken war. Als Absorptionsmittel für Sauerstoff benutzte ich gelben Phosphor. Der Einsatz E des Meßgefäßes (Abb. 1) enthielt statt Kalilauge Wasser, in das ein Stäbchen frisch geschmolzenen Phosphors zur Hälfte eintauchte. Die Gärungsmessungen begannen, nachdem die Gefäße 30 Minuten geschüttelt worden waren, so daß der Phosphor Zeit hatte, den Sauerstoff aus dem Gasraum zu absorbieren.

Es zeigte sich, daß Kohlenoxyd bei dem Druck von einer Atmosphäre die Gärung nicht hemmt. Die Gärungen in Kohlenoxyd und in Stickstoff waren gleich (vgl. Protokoll 3). Kohlenoxyd ist also eine Substanz, mit der man, ähnlich wie mit Blausäure oder Schwefelwasserstoff, die Atmung von der Gärung trennen kann.

III. Gärung in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen.

Bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff ist die Atmung der Bäckerhefe (in Volumina O_2) etwa halb so groß wie die anaerobe Garung (in Volumina CO_2) Die Atmung wurde also genugen, um die Garung vollstandig zu hemmen. Im allgemeinen geschieht das nicht, sondern es bleibt unter aeroben Bedingungen ein kleiner Teil der Garung ubrig, die „aerobe" Garung.

Abb. 2.

Um Atmung und Garung in kohlenoxydhaltigem Gas zu untersuchen, dienten Gefaßpaare[1] nach Abb 2 Tabelle 2 enthalt das Ergebnis von drei Versuchsreihen Die Garung steigt, wenn die Atmung sinkt Doch reicht die Atmungshemmung nicht aus, um den Anstieg der Gärung zu erklären, vielmehr kommt eine Wirkung des Kohlenoxyds auf die Pasteursche Reaktion[2] hinzu. Trotz unvollkommen gehemmter Atmung findet man bei hoheren Kohlenoxyddrucken fast den anaeroben Garungswert

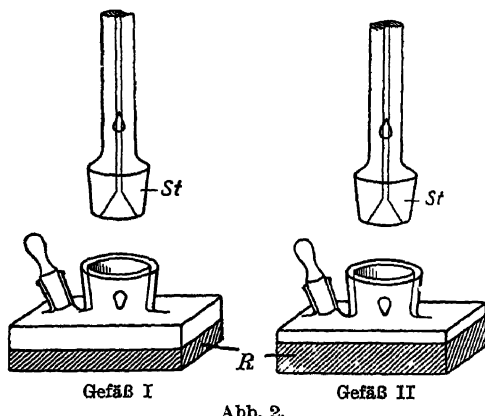



Tabelle 2. *Atmung und Garung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff.*

Nr	Versuchszeit Min.	Gasmischungen in Vol.-%	Atmung (x_{O_2}) cmm	Gärung (x_G) cmm	Hemmung der Atmung %	Steigerung der Gärung %	Meyerhof-Quotient
1 (Protokoll 4)	40	79 N_2, 21 O_2	—76	+ 33			1,56
		80 CO, 20 O_2	—58	+ 80	24	140	1,19
		Luft, 10^{-3} n HCN	—	+ 151			
2 (Protokoll 5)	20	95 N_2, 5 O_2	—21,6	+ 15,4			1,98
		75 CO, 5 O_2	— 7,3	+ 54,2	66	250	0,65
		Luft, 10^{-3} n HCN	—	+ 58,0			
3	30	79 N_2, 21 O_2	—51	+ 30,5			1,48
		80 CO, 20 O_2	— 38,8	+ 61	24	100	1,16
		95 CO, 5 O_2	—10,4	+ 98	80	220	0,77
		Luft, 10^{-3} n HCN	—	+ 106			

Zur Methodik.

1. Bei Stoffwechselmessungen nach dem Prinzip der Abb. 2 arbeitet man mit gleichen Hefemengen oder mit gleichen Hefekonzentrationen. Korrekter

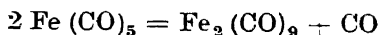
[1] Vgl. O. Warburg: diese Zeitschr. **152**, 51. 1924; Formeln in Protokoll 4.
[2] Derselbe: Ebendaselbst **172**, 432 1926.

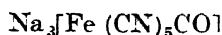
ist die zweite Anordnung, da bei ihr etwaige Beeinflussungen des Stoffwechsels durch Endprodukte des Stoffwechsels keine Fehler bedingen. 2. Eine Fehlerquelle bei Hefeversuchen besteht darin, daß man die Löslichkeit der Kohlensäure in starken Phosphatlösungen — die nicht bekannt ist — falsch schätzt und so mit falschen Gefäßkonstanten rechnet. Man tut deshalb gut, mit möglichst verdünnten Phosphatlösungen zu arbeiten.

Beide Punkte sind bei den bisherigen[1] Anwendungen der Methode auf den Hefestoffwechsel nicht genügend berücksichtigt worden. Zu empfehlen ist eine Kontrolle, in der man die anaerobe Gärung in zwei Gefäßen, die verschiedene Flüssigkeitsmengen enthalten, mißt. Beide Gefäße müssen die gleiche Gärung pro Milligramm Hefe ergeben.

IV. Wirkung des Lichts.

Bei einem Besuch in Dahlem erzählte mir A. V. Hill von Arbeiten aus dem Cambridger physiologischen Institut, nach denen die Affinität zwischen Kohlenoxyd und Hämoglobin abnimmt, wenn man belichtet Auch andere Kohlenoxyd-Eisenverbindungen dissoziieren, wie ich beim Studium der Literatur fand, im Licht Die erste Arbeit über die Lichtempfindlichkeit von Kohlenoxyd-Eisenverbindungen ist von Haldane und Smith[2]. Sie betrifft das Kohlenoxyd-Hämoglobin und stammt aus dem Jahre 1896 Später (1907) teilten Dewar[3] und Jones mit, daß Eisencarbonyl bei Belichtung Kohlenoxyd abspaltet, wobei sich die Reaktion abspielt

$$2\,Fe\,(CO)_5 = Fe_2\,(CO)_9 + CO$$

Im Gegensatz zu Eisencarbonyl ist Nickelcarbonyl nach Dewar nicht lichtempfindlich Manchot[4] erwähnt 1912, daß die Verbindung

$$Na_3[Fe\,(CN)_5CO]$$

im Sonnenlicht Kohlenoxyd entwickelt

Auf Grund der zitierten Arbeiten legte ich mir die Frage vor ob nicht auch die Verbindung zwischen Atmungsferment und Kohlenoxyd bei Belichtung dissoziiere Dann mußte die Atmungshemmung bei Belichtung kleiner werden Das ist nun in der Tat der Fall, und zwar in einem solchen Maße daß bei Belichtung die Atmungshemmung zum größeren Teil verschwindet Indem man den Atmungstrog abwechselnd mit einer elektrischen Lampe belichtet und wieder verdunkelt, kann man beliebig oft Atmung entstehen und verschwinden lassen

Tabelle 3 enthält ein Versuchsbeispiel. Zur Belichtung diente eine $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampe von 75 Watt Stromverbrauch, deren leuch-

---

[1] Meyerhof, O. diese Zeitschr 162, 43 1925 — Negelein, E Ebendaselbst 165, 203. 1925.

[2] Haldane, J. u. Smith. Journ. Physiol 20, 497. 1896

[3] Dewar, J. u. Jones: Proc. Roy. Soc. (A) 76, 558. 1905; 79, 66 1907.

[4] Manchot, W.: Chem. Ber. 45, 2869 1912.

Tabelle 3

20° Pro Gefaß 8 mg Backerhefe und 2 ccm m/20 KH_2PO_2 m/18 Glucose.

	95% N_2, 5% O_2 (A_0) cmm O_2	95 % CO, 5% O_2 (A) cmm O_2	$\frac{A_0-A}{A_0}$ %
10′ dunkel	17,4	5,7	69
10′	15,4	4,5	
10′ hell	16,2	14,6	14
10′	16,0	13,2	
10′ dunkel	17,0	5,0	71
10′	16,0	4,5	
10′ hell	14,0	12,5	14
10′ „	15,0	12,5	
10′ dunkel	16,0	5,0	71
10′ „	15,0	4,0	
usw			

tender Faden etwa 4 cm von dem Boden des Atmungstrogs entfernt war Die Atmungshemmung im Dunkeln betrug rund 70 % und sank bei Belichtung auf 14 %

Abb. 3 ist eine graphische Darstellung desselben Versuchs Die Neigung der Atmungskurve in Stickstoff-Sauerstoff ist nahezu unab-

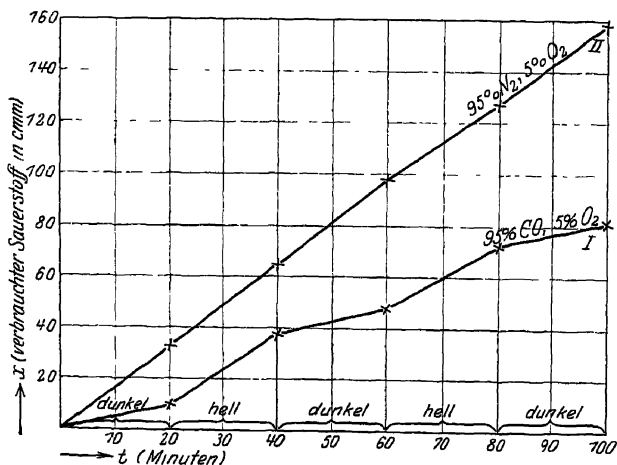



Abb. 3.

hangig von der Belichtung. Die Atmungskurve in Kohlenoxyd erleidet jedesmal bei Belichtung und Verdunkelung einen Knick, sie wird steiler bei Belichtung und flacher bei Verdunkelung.

Mißt man nicht die Atmung, sondern die Garung in Kohlenoxyd, so hat man gleichfalls beim Belichten und Verdunkeln einen Knick der

Kurve, jedoch in umgekehrter Richtung wie bei den Atmungsversuchen. Hier ist die Kurve im Hellen flacher als im Dunkeln, weil bei Belichtung die Gärung abnimmt. Man vergleiche die Abb. 4 aus der außerdem hervorgeht, daß in kohlenoxydfreiem Gas weder die anaerobe noch die aerobe Gärung durch Belichtung merklich beeinflußt wird.

Abb. 4

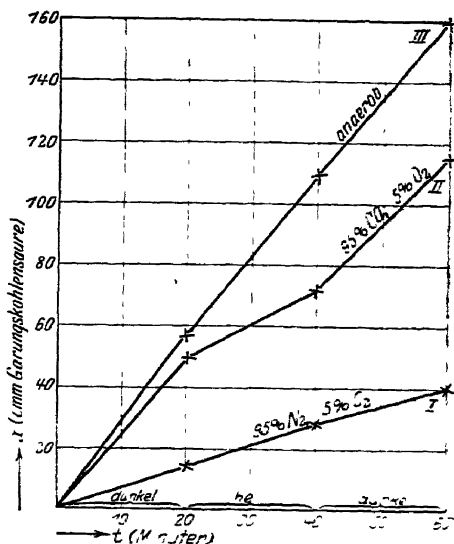
V. Einfluß der Wellenlänge des Lichts.

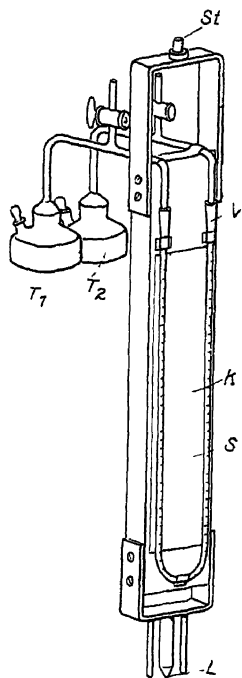
Um die im vorigen Abschnitt geschilderten Erscheinungen näher zu untersuchen, isolierte ich folgende Spektralbezirke[1]

Blau . .	436 $\mu\mu$	aus der Strahlung der Quecksilberdampflampe.
Grün . .	546 $\mu\mu$	
Gelb . .	578 $\mu\mu$	
Rot	700 bis 750 $\mu\mu$	aus der Strahlung einer Metallfadenlampe

Wegen der außerordentlich schwachen Absorption dieser Wellenlängen durch Hefe war es nicht möglich, die Absorption des Lichtes zu messen und sie mit der photochemischen Wirkung zu vergleichen. Immerhin aber konnte festgestellt werden, welche der genannten Spektralbezirke photochemisch wirken und ferner wie sich die Größen der photochemischen Wirkungen verhalten, wenn man Hefezellen in verschiedenfarbiges Licht gleicher Intensität bringt.

Die Messung der Strahlungsintensität geschah bolometrisch nach E. Warburg. Die Intensitäten wurden so ausgeglichen, daß sie in allen Spektralbezirken rund $7 \cdot 10^{-5}$ cal/qcm·sec betrugen. Da die dünnen Hefesuspensionen nur einen kleinen Bruchteil der eingestrahlten Energie absorbierten, so befanden sich alle Hefezellen im Versuchsgefäß unter der Wirkung der an der Eintrittsstelle gemessenen Lichtintensität. Im Vergleich zu der Intensität der Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche ($\sim 10^{-2}$ cal/qcm·sec) war diese Intensität klein.

Zur Messung der photochemischen Wirkung standen zwei Wege offen: Messung der Atmungszunahme oder der Gärungsabnahme. Ich wählte den zweiten Weg, bestimmte also in Kohlenoxyd-Sauerstoff die Abnahme der Gärung unter dem Einfluß der Bestrahlung. In den

[1] Vgl. bezüglich der in diesem Abschnitt befolgten Methoden Zeitschr. f. physikalische Chem. **106**, 191. 1923.

Versuchstrog des Differentialmanometers (Abb 5) fullte ich 5 ccm Hefesuspension ein (20 mg Backerhefe, Frischgewicht, in m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose), in den Kontrolltrog die gleiche Menge der gleichen, aber hefefreien Losung.

Der Rauminhalt der Gefaße war groß gegen das Volumen der eingefullten Flussigkeit (v_G 48,5 ccm, v_F 5 ccm), so daß die Gefaßkonstanten fur Sauerstoff (K_{O_2}) und fur Kohlensaure (K_{CO_2}) nahezu gleich waren Die Atmung machte sich also manometrisch kaum[1] geltend und die Gärungskohlensaure x_G war nahezu proportional dem entwickelten Druck H

$$\dot{x}_G = H K_{CO_2}.$$

Die Sperrflussigkeit des Differentialmanometers war Capronsaure Die Druckanderungen wurden von 5 zu 5 Minuten mit einem Katethometermikroskop abgelesen. Es schien, als ob die Wirkung der Bestrahlung und Verdunkelung immer erst nach einer gewissen Induktionszeit einsetzte, von der ich nicht sagen kann, ob sie durch innere oder äußere Ursachen bedingt war Wie dem auch sei, bei der Berechnung ließ ich die ersten 5 Minuten nach Verdunkelung oder Bestrahlung heraus und berechnete die photochemische Wirkung aus den folgenden, in den Tabellen mit einem Kreuz versehenen Perioden Jeder Bestrahlungsversuch war von zwei Dunkelversuchen eingerahmt, deren Mittel die „Dunkelgarung" ergab

Abb 5.

Die Tabellen 4 und 5 enthalten je eine Versuchsreihe Im langwelligen Rot, zwischen 700 und 750 $\mu\mu$, war eine photochemische Wirkung nicht nachweisbar Im Gelb, Grun und Blau war eine Wirkung vorhanden, und zwar im Blau eine $2^1/_2$- bis 3mal großere als im Gelb und im Grun

Die Versuche beweisen, daß das Atmungsferment — in seiner Verbindung mit Kohlenoxyd — Blau, Grun und Gelb absorbiert, daß also die Atmungsferment-Kohlenoxydverbindung ein Farbstoff ist Nehmen wir an, daß die spezifischen photochemischen Wirkungen nicht verschiedener sind, als nach der Quantentheorie zu erwarten, so folgt weiterhin aus den Versuchen der Tabellen 4 und 5, daß der Farbstoff im Blau stärker absorbiert als im Grun und im Gelb

---

[1] Denn es ist der durch die Atmung erzeugte Druck gleich $-\frac{x_{O_2}}{K_{O_2}} + \frac{x_{O_2}}{K_{CO_2}}$, falls der respiratorische Quotient 1 ist Vgl. dazu O. Warburg, diese Zeitschr. **172**, 440. 1926.

Tabelle 4. 95% CO, 5% O_2.
20°. 20 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in 5 ccm m/20 KH_2PO_4 m/18 Glucose. Gasraum 48,5 ccm.

Wellenlänge	Intensität cal / qcm × Sekunden	Zeit	Druckänderung in mm Capronsäure	Photochemische Wirkung
—	—	5′ dunkel	+ 11,1 ×	
436 μμ (blau)	7,2 × 10⁻⁵	5′ hell 5′ „ 5′ „	+ 5,5 − 4,3 × + 4,2	11,6—4,3 = 7,3 mm
—	—	5′ dunkel 5′ „	+ 10,0 − 12,1 ×	
546 μμ (grün)	7,4 × 10⁻⁵	5′ hell 5′ „	− 10,1 − 9,4 ×	11,9—9,4 = 2,5 mm
—	—	5′ dunkel 5′ „	+ 11,1 − 11,7 ×	
578 μμ (gelb)	7,7 × 10⁻⁵	5′ hell 5′ „	− 9,2 − 8,5 ×	11,3—8,5 = 2,8 mm
—	—	5′ dunkel 5′ „	− 10,6 − 10,9 ×	

Tabelle 5. 95% CO, 5% O_2.
20°. 20 mg Bäckerhefe in 5 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Gasraum 48,5 ccm.

Wellenlänge	Intensität cal / qcm × Sekunden	Zeit	Druckänderung in mm Capronsäure	Photochemische Wirkung
—	—	5′ dunkel	− 12,6	
700—750 μμ (rot)	7,4 × 10⁻⁵	5′ hell 5′ „	− 12,7 − 12,8	keine
—	—	5′ dunkel 5′ „ 5′ „	− 13,0 − 12,6 − 12,6	
436 μμ (blau)	5,4 × 10⁻⁵	5′ hell 5′ „	− 6,7 − 5,4	12,2—5,4 = 6,8
—	—	5′ dunkel 5′ „	− 10,6 − 11,8	

Neben der relativen photochemischen Wirkung ist ihre absolute Größe von Interesse. Multiplizieren wir die Lichtintensität, die an der Eintrittsstelle in den Gärungstrog herrscht, mit der bestrahlten Fläche (17 qcm) und der Versuchszeit (300 Sekunden), so erhalten wir die gesamte in der Versuchszeit in den Trog eingestrahlte Energie in Kalorien. Multiplizieren wir ferner die manometrischen Lichtwirkungen mit der Gefäßkonstante für Kohlensäure (K_{CO_2}), so erhalten wir die durch Bestrahlung bewirkte Gärungshemmung in Kubikmillimetern Gärungs-

kohlensaure Dividieren wir die Kubikmillimeter CO_2 durch die eingestrahlten Kalorien, so erhalten wir die Garungshemmung pro Kalorie eingestrahlter Lichtenergie

Tabelle 6 enthalt das Ergebnis dieser Rechnung, die fur Blau eine Garungshemmung von 89 cmm Kohlensäure pro Kalorie eingestrahlten Lichtes ergibt. Ware die eingestrahlte Energie von den Hefezellen vollstandig absorbiert worden, so hatte, wie man leicht berechnen kann, jedes absorbierte Lichtquantum $^1/_4$ Molekul Garungskohlensaure zum Verschwinden gebracht (oder am Entstehen verhindert) Da jedoch die Hefesuspension nur einen sehr kleinen Teil der eingestrahlten Energie absorbierte, so folgt, daß jedes absorbierte Quantum des blauen Lichtes sehr viele Molekule Garungskohlensaure zum Verschwinden bringt (oder am Entstehen verhindert) Wir haben also hier keine einfache Beziehung zwischen absorbierten Quanten und Stoffumsatz Eine solche ist auch nicht zu erwarten, da das Licht auf den Stoffumsatz wirkt, indem es ein inaktiviertes Ferment reaktiviert

Tabelle 6 $K_{CO_2} = 4{,}53$ (qmm)

Wellenlange $\mu\mu$	In 5 Min. in den Garungstrog eingestrahlte Energie cal	In 5 Min beobachtete Lichtwirkung mm	Garungshemmung in 5 Min. cmm CO_2	$\frac{\text{cmm } CO_2}{\text{cal}}$
436	0,37	7,3	33	89
546	0,378	2,5	11,4	30
578	0,394	2,8	12,7	32
700—750	0,38	0	0	0

VI. Ergebnisse.

1 Das Atmungsferment der Hefe verbindet sich mit Kohlenoxyd.

2 Bei Gegenwart von Kohlenoxyd und Sauerstoff verteilt sich das Atmungsferment zwischen beiden Gasen Deshalb hemmt ein bestimmter Kohlenoxyddruck die Atmung um so starker, je niedriger der Sauerstoffdruck ist.

3. Die Verbindung des Atmungsferments mit Kohlenoxyd dissoziiert bei Belichtung, wie andere Kohlenoxyd-Eisenverbindungen

4 Das Atmungsferment in seiner Verbindung mit Kohlenoxyd ist ein Farbstoff Es absorbiert die Wellenlangen 436, 546 und 578 $\mu\mu$, und zwar wahrscheinlich 436 $\mu\mu$ stärker als 546 und 578 $\mu\mu$

5. Da die Kohlenoxyd-Metallverbindungen Molekulverbindungen sind, so ist anzunehmen, daß auch die Bindung des Sauerstoffs an das Metall des Atmungsferments primär durch Nebenvalenzen erfolgt. Ob sich dann weiterhin bei der Tatigkeit des Atmungsferments die Hauptvalenz des Metalls ändert oder nicht, bleibt zunachst unentschieden.

VII. Protokolle.

Protokoll 1.

Der Versuch zeigt, daß die Atmung der Hefe durch CO gehemmt wird und daß die Hemmungen reversibel sind. 20°. Je 8 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Im Einsatz KOH.

Volumina in ccm . . .	v_F 2,4 v_G 15,5	v_F 2,4 v_G 14,3	v_F 2,4 v_G 13,7	v_F 2,4 v_G 13,5
Gefäßkonstant. in qmm	k_{O_2} 1,45	k_{O_2} 1,34	k_{O_2} 1,29	k_{O_2} 1,27
Gasmisch. in Vol.-% . .	79,1 N_2	80,1 CO	89,9 N_2	88,6 CO
(Gesamtdr. 751 mm Hg)	20,9 O_2	19,9 O_2	10,1 O_2	11,4 O_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 30 Min.	—40,5 58,8	—29,5 39.5	—44,5 57,2	—18,5 23,5
60 Min . .	—80,5 117	—57,0 76,5	—90,5 116	—36,0 45,7
	↓	↓	↓	↓
Gasmisch. in Vol.-% .	79.1 N_2	79,1 N_2	89,9 N_2	89,9 N_2
	20,9 O_2	20,9 O_2	10,1 O_2	10,1 O_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 30 Min. . . .	—37,5 *54*	—42 *56*	—45 *58*	—45 *57*

Daraus folgt.

Hemmung der Atmung durch 80,1% CO, 19,9% O_2

$$\frac{117 - 76,5}{117} = 34,6\,\%.$$

Hemmung der Atmung durch 88,6% CO, 11,4% O_2

$$\frac{116 - 45,7}{116} = 60,5\,\%.$$

Nach Entfernung des Kohlenoxyds war die Hemmung der Atmung verschwunden, wie die letzte Horizontalspalte zeigt

Protokoll 2.

Der Versuch zeigt, daß — bei ungefähr gleichen CO-Drucken — die Atmungshemmung um so großer ist, je niedriger der Sauerstoffdruck 37,5° Je 4 mg Backerhefe (Frischgewicht) in 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose Im Einsatz KOH

Volumina in ccm	v_F 2,4 v_G 15,5	v_F 2,4 v_G 14,3	v_F 2,4 v_G 13,7	v_F 2,4 v_G 13,5
Gefaßkonstant in qmm	k_{O_2} 1,38	k_{O_2} 1,27	k_{O_2} 1,22	k_{O_2} 1,20
Gasmisch in Vol.-%	79,1 N_2	76,8 CO	95,7 N_2	74,7 CO
(Barometerstand 751 mm Hg)	20,9 O_2	23,2 O_2	4,3 O_2	5,3 O_2
				20,0 N_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 20 Min	—37 51	—27,5 34,9	—36 44	—10 12,0
nach 40 Min.	—72 99,5	—51,5 65,2	—70 85,2	—16,5 19,8

Daraus folgt.

Hemmung der Atmung durch 76,8% CO, 23,2% O_2

$$\frac{99,5 - 65,2}{99,5} = 34\%$$

Hemmung der Atmung durch 74,7 % CO, 5,3% O_2

$$\frac{85,2 - 19,8}{85,2} = 77\%$$

Protokoll 3.

Der Versuch zeigt, daß CO — selbst bei den niedrigsten O_2-Drucken, die man erreichen kann — die Garung der Hefe nicht hemmt. 20°. Je 7 mg Backerhefe in 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose Im Einsatz gelber Phosphor.

Volumina in ccm. . Gefaßkonstanten in qmm	v_F 2,3 v_G 13,8 k_{CO_2} 1,48		v_F 2,3 v_G 14,4 k_{CO_2} 1,54	
Gasraum . .	100 Vol -% N_2		100 Vol.-% CO	
Nachdem 30 Min. lang mit Phosphor zur Entfernung von O_2 geschuttelt worden war, begann die Garungsmessung	mm	cmm	mm	cmm
	+ 64	95	+ 61	94

Die Garungen in Sticksotff und in Kohlenoxyd waren also — innerhalb der Grenzen der Meßfehler — gleich

Protokoll 4.

Atmung und Garung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff

Formeln

$$(O_2 \text{ in cmm}) \quad x_{O_2} = \frac{H K_{CO_2} - h k_{CO_2}}{\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} - \frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}}}$$

$$(\text{Atmungs-} + \text{Garungs-}CO_2 \text{ in cmm}) \quad x_S = \frac{H K_{O_2} - h k_{O_2}}{\frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}} - \frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}}}$$

$$(\text{Garungs-}CO_2 \text{ aerob}): \; x_G = x_S + x_{O_2}$$

$$(\text{Garungs-}CO_2, \text{ anaerob}): \; x_G = h k_{CO_2}$$

wo samtliche x-Werte auf gleiche Zeiten zu beziehen sind.

Versuch.

Der Versuch zeigt, daß in Kohlenoxyd-Sauerstoff die Atmung der Hefe abnimmt, die Garung der Hefe zunimmt 20° Pro Gefaß 7 mg Backerhefe (Frischgewicht) in m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose $\alpha_{O_2} = 0{,}03$ $\alpha_{CO_2} = 0{,}87$

Gasmischungen in Vol -% . .	79 N_2, 21 O_2		80 CO, 20 O_2	
ccm . .	v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,7	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1
qmm	K_{O_2} 0,594 K_{CO_2} 1,18	k_{O_2} 1,01 k_{CO_2} 1,26	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20
	H (mm)	h (mm)	h (mm)	h (mm)
20 Min. .	—16	+ 6,5	+ 12	+ 27
40 Min. .	—33,5	+ 12,5	+ 23	+ 54
	↓ 10^{-3} n. HCN	↓ 10^{-3} n. HCN		↓ 10^{-3} n. HCN
	H (mm)	h (mm)		h (mm)
20 Min. .	+ 64,5	+ 59,5		+ 62,0
	Es war also in 40 Min. x_{O_2} = — 76 cmm; x_S = + 109 „; (aerob) x_G = + 33 „; (anaerob) x_G = + 151 „; Meyerhof-Quotient 1,56		Es war also in 40 Min.: x_{O_2} = — 58 cmm; x_S = + 138 „; (aerob) x_G = + 80 „; (anaerob) x_G = + 149 „; Meyerhof-Quotient 1,19	

Protokoll 5.

Atmung und Gärung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff. Der Versuch zeigt, daß in Kohlenoxyd die Atmung abnimmt, die Gärung zunimmt. 20°. Pro Gefäß 7 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. $\alpha_{O_2} = 0,03$. $\alpha_{CO_2} = 0,87$.

Gasmischungen in Vol.-%	79 N_2, 21 O_2		95 N_2, 5 O_2		75 CO, 5 O_2, 20 N_2	
ccm	v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,7	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1
qmm	K_{O_2} 0,594 K_{CO_2} 1,18	k_{O_2} 1,01 k_{CO_2} 1,26	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20
20 Min.	H (mm) 6,5	h (mm) + 8,5	H (mm) − 3,0	h (mm) + 8,0	H (mm) + 37	h (mm) + 42,5 ↓ Luft, 10^{-3} n. HCN 20′: + 48,5 mm
	Es war also in 20 Min: x_{O_2} = − 25,2 cmm x_S = + 41,7 „ (aerob) x_G = + 16,5 „ (anaerob) x_G = + 58 „ Meyerhof-Quotient: 1,65		Es war also in 20 Min.: x_{O_2} = − 21,6 cmm x_S = + 37 „ (aerob) x_G = + 15,4 „ (anaerob) x_G = + 58 „ Meyerhof-Quotient: 1,98		Es war also in 20 Min.: x_{O_2} = − 7,7 cmm x_S = + 61,0 „ (aerob) x_G = + 53 „ (anaerob) x_G = + 58 „ Meyerhof-Quotient: 0,65	

Biochem Zeitschr 189, 350 1927.

Über den Stoffwechsel der Hefe.

Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem)

(Eingegangen am 5 September 1927.)

Mißt man den Stoffwechsel kauflicher Backerhefen bei 20° in Bierwürze, so findet man Werte wie die folgenden[1]

Backerhefe der Fabrik Haak, Guben:

$$Q_{O_2} = -96 \qquad Q_G^{N_2} = +192 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}5\,,$$

Backerhefe aus dem Fabrikbetrieb des Berliner Instituts fur Garungsgewerbe

$$Q_{O_2} = -78 \qquad Q_G^{N_2} = +227 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}34\,.$$

Mißt man unter den gleichen Bedingungen im Laboratorium gezuchtete Reinkulturen von Heferassen, von denen die Technik bei der Erzeugung der Backerhefe ausgeht, so findet man beispielsweise·

Rasse 12 des Berliner Instituts fur Garungsgewerbe

$$Q_{O_2} = -11 \qquad Q_G^{N_2} = +240 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}04\%\,,$$

Die im Fabrikbetrieb gezuchteten Backerhefen atmen also acht- bis zehnmal so stark, wie die im Laboratorium gezuchtete Reinkultur Dies spricht dafur, daß die große Atmung der kauflichen Backerhefen keine integrierende Eigenschaft bestimmter Heferassen ist, sondern eine Eigenschaft, die bei der Fabrikation der Hefe entsteht und unter anderen Wachstumsbedingungen wieder verschwindet Ich habe mich mit der Frage beschaftigt, welche Maßnahmen der Fabrikation die große Atmung erzeugen.

Es gibt zwei Verfahren der Backerhefefabrikation, das alte „Wiener" Verfahren und das neue „Lüftungsverfahren". Bei beiden Verfahren laßt man die Hefe zunachst in zuckerhaltigen Flussigkeiten unter maßiger Luftung wachsen. Charakteristisch für das neue Verfahren ist die

[1] Q_{O_2} = Atmung, $Q_G^{N_2}$ = anaerobe Gärung, beide in Kubikmillimeter (O_2 oder CO_2) pro Stunde und Milligramm Trockensubstanz.

Fortsetzung und Steigerung der Lüftung zu einer Zeit, zu der die Hefe den Zucker der Nährlösung schon wesentlich verbraucht hat. Dann wächst die Hefe vorwiegend auf Kosten der Atmung (Alkoholverbrennung?). Der technische Vorteil des neuen Verfahrens ist offenbar der, daß man pro Gramm verbrauchten Zuckers mehr Hefe erntet als bei dem alten Verfahren.

Die oben angeführten käuflichen Backerhefen stammen von Betrieben, die nach dem neuen Verfahren arbeiten Nach dem alten Verfahren arbeiten in Deutschland nur noch zwei Fabriken. Ich habe die Bäckerhefe einer dieser Fabriken (Christiansen in Flensburg) untersucht und folgende Stoffwechselgrößen gefunden (Bierwürze, 20°):

$$Q_{O_2} = -20 \qquad Q_G^{N_2} = +246 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}08.$$

Wie man sieht, ist die Atmung dieser Bäckerhefe viel kleiner als die Atmung der nach dem Lüftungsverfahren gewonnenen Hefe ($^1/_4$ bis $^1/_5$). Handelt es sich hier nicht um Unterschiede der Rassen, sondern um Unterschiede in der Fabrikation, so muß es möglich sein, ausgehend von einer Reinkultur, Hefen mit großer oder kleiner Atmung zu zuchten, je nachdem man das neue oder das alte Verfahren der Technik nachahmt

Ich impfte Bierwurze mit einer Öse der Heferasse 12, durchlüftete bei 30° und entnahm zwei Hefeproben zu verschiedenen Zeiten: die erste, als noch die Hauptmenge des Zuckers in der Würze vorhanden war, die zweite 3 Tage nach Verbrauch des Zuckers Die Stoffwechselgroßen waren (Bierwurze, 20°)

Rasse 12 aus zuckerhaltiger Wurze (Alter der Kultur 8 Stunden).

$$Q_{O_2} = -11 \qquad Q_G^{N_2} = +240 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}04$$

Rasse 12 aus zuckerfreier Wurze (3 Tage nach Verbrauch des Zuckers weiter durchluftet)

$$Q_{O_2} = -49 \qquad Q_G^{N_2} = +174 \qquad \frac{Q_{O_2}}{Q_G^{N_2}} = 0{,}28$$

Die Atmung der Rasse 12 stieg also bei der Durchluftung in zuckerfreier Losung auf das Vierfache, das Verhaltnis Atmung/Garung auf das Siebenfache

Aus den angeführten Beobachtungen ist zu schließen, daß die große Atmung der kauflichen Backerhefe eine Eigenschaft ist, die bei der Fabrikation entsteht, wenn man die Hefe zwingt, auf Kosten der Atmung zu wachsen. Vielleicht kommt in der Technik, die nicht mit Rein-

kulturen arbeitet, hinzu, daß bei der Lüftung in zuckerarmer Lösung die stark atmenden wilden Hefen sich anreichern, die die Bäckerhefen des Handels immer in wechselnder Menge verunreinigen.

Methode.

Der Stoffwechsel wurde manometrisch in zwei kegelförmigen[1] Gefäßen gemessen, von denen das erste zur Atmungsmessung und das zweite zur Gärungsmessung diente. Bei der sauren Reaktion der Bierwürze (p_H etwa 5,6) war die kompliziertere Anordnung, wie sie für Versuche mit tierischen Zellen notwendig ist, überflüssig. Im einzelnen war die Anordnung folgende:

	Gefäß I	Gefäß II
Einsatz	0,3 ccm 5% KOH	leer
Birne	0,3 ccm 5% KOH	leer
Hauptraum	2 ccm Bierwürze 0,005 ccm Zellen	2 ccm Bierwürze 0,002 ccm Zellen
Gasraum	Luft	Stickstoff, über Kupfer geglüht
Temperatur	20°	20°

Die Versuchszeit betrug 10—20 Minuten und war so kurz, daß die Vermehrung der Hefe während der Messung nicht in Betracht kam. Auch aus anderen Gründen sollten bei derartigen Versuchen die Meßzeiten so kurz wie möglich sein. Denn es ist klar, daß Unterschiede im Stoffwechsel, die durch verschiedene Züchtungsbedingungen erzeugt worden sind, durch zu lange Meßzeiten wieder verwischt werden können.

Ich habe früher[2] bei manometrischen Messungen des Hefestoffwechsels nicht Bierwürze, sondern glucosehaltige Phosphatlösung benutzt, ein Milieu, in dem die Hefe kaum wächst, und das im allgemeinen der Bierwürze vorzuziehen ist. Für die Untersuchung der Lebensbedingungen der Hefe aber — der Stoffwechseleigenschaften der Rassen und des Stoffwechsels beim Wachstum — sind einfach zusammengesetzte Lösungen, wie Glucose-Phosphat, ungeeignet. Denn der Stoffwechsel vieler Heferassen ändert sich beim Übergang von dem natürlichen Milieu zu einfachen Lösungen sehr erheblich.

Herrn Dr. Glaubitz vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe möchte ich auch hier danken für die Überlassung von Stämmen reiner Hefen sowie vielfache Belehrung über Züchtung von Hefen.

[1] Abbildung diese Zeitschr. 177, 471. 1926.
[2] H. S. 81, 99. 1912.

Biochem. Zeitschr. 189, 354. 1967.

Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung.

Von

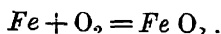
Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. September 1927.)

Mit 4 Abbildungen.

Im ersten Teile dieser Arbeit wird gezeigt, daß die Primarreaktion der Atmung eine Reaktion zwischen einem Atom Eisen und einem Molekul Sauerstoff ist

$$Fe + O_2 = Fe\,O_2 .$$

Im zweiten Teile wird versucht, die Theorie der Atmung auf das Garungsproblem anzuwenden Das Ergebnis ist, daß Atmung und Garung ihrem chemischen Mechanismus nach verwandte Vorgänge sind Das Garungsferment reagiert zwar nicht, wie das Atmungsferment mit Kohlenoxyd, selbst nicht bei einem Kohlenoxyddruck von 60 Atmospharen aber es bildet mit Stickoxyd eine dissozuerende Verbindung.

1. Theorie der Verteilung.

Bezeichnen wir das Atmungsferment mit Fe, so sind unsere Ausgangsgleichungen

$$Fe + O_2 \rightleftarrows Fe\,O_2 \tag{1}$$

$$Fe + CO \rightleftarrows Fe\,CO \tag{2}$$

Ist die Atmung klein so ist

$$-\frac{dFe\,O_2}{dt} = Z \cdot Fe\,O_2 - B \cdot Fe \cdot O_2 , \tag{3}$$

$$-\frac{dFe\,CO}{dt} = z \cdot Fe\,CO - b \cdot Fe \cdot CO , \tag{4}$$

wo Z und z die Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls und B und b die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung bezeichnen $Fe\,O_2$, $Fe\,CO$, Fe, O_2 und CO sind auf das gleiche Volumen zu beziehen.

Im Gleichgewicht sind die Differentialquotienten nach der Zeit Null, also

$$\frac{Fe\,O_2}{Fe \cdot O_2} = \frac{B}{Z} = k_{O_2}\,, \tag{5}$$

$$\frac{Fe\,CO}{Fe\ CO} = \frac{b}{z} = k_{CO} \tag{6}$$

k_{O_2} ist die Affinitatskonstante der Reaktion (1), k_{CO} die Affinitatskonstante der Reaktion (2).

Dividieren wir (5) durch (6), so erhalten wir die Verteilungsgleichung

$$\frac{Fe\,O_2}{Fe\,CO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z} \cdot \frac{z}{b} = \frac{k_{O_2}}{k_{CO}} = K\,, \tag{7}$$

in der also K das Verhaltnis der Affinitäten des Atmungsferments zu Sauerstoff und Kohlenoxyd ist.

Storung durch die Atmung. Ist die Atmung nicht Null, so wird $Fe\,O_2$ nicht nur durch Dissoziation zu Fe und O_2 verbraucht, sondern auch durch die Atmung. Dann kommt in Gleichung (3) ein Glied $Z' \cdot Fe\,O_2$ hinzu

$$-\frac{dFe\,O_2}{dt} = Z \cdot Fe\,O_2 + Z' \cdot Fe\,O_2 - B \cdot Fe \cdot O_2\,,$$

während Gleichung (4) unverandert bleibt,

$$-\frac{d\,Fe\,CO}{dt} = z \cdot Fe\,CO - b \cdot Fe \cdot CO\,.$$

Im stationären Zustande sind die Differentialquotienten nach der Zeit Null, also

$$\frac{Fe\,O_2}{Fe\ O_2} = \frac{B}{Z + Z'} = k'_{O_2}\,, \tag{5a}$$

$$\frac{Fe\,CO}{Fe \cdot CO} = \frac{b}{z} = k_{CO} \tag{6}$$

und nach Division von (5a) durch (6)

$$\frac{Fe\,O_2}{Fe\,CO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z}{b} = \frac{k'_{O_2}}{k_{CO}} = k\,. \tag{8}$$

Die Atmung stört also das Gleichgewicht k'_{O_2} ist kleiner als k_{O_2} und folglich auch k kleiner als K. k ist nicht das Verhaltnis der Affinitäten k_{O_2}/k_{CO}, sondern gibt nur den Minimalwert fur dies Verhältnis an,

$$\frac{k_{O_2}}{k_{CO}} \geqq k\,. \tag{8a}$$

Störung durch Belichtung Bei Belichtung ändert sich die Verteilung des Atmungsferments zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd. Beruht dies auf einem photochemischen Zerfall der Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments, so wird $FeCO$ nicht nur durch spontane Dissoziation zu Fe und CO verbraucht, sondern auch durch photochemische Dissoziation, und es kommt in Gleichung (4) ein Glied hinzu. das der photochemischen Dissoziation Rechnung trägt.

Bei der Ableitung der Gleichungen machen wir zur Bedingung daß das Licht beim Durchgang durch die Versuchsobjekte praktisch nicht geschwächt wird, eine Bedingung, die wegen der schwachen Absorption der Zellen experimentell leicht zu erfüllen ist. Dann ist die Lichtmenge, die von der Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments in der Zeiteinheit absorbiert wird,

$$-di = \alpha \cdot i \cdot FeCO, \tag{9}$$

wo i die in der Zeiteinheit in das Objekt eingestrahlte Energie bedeutet und α den Absorptionskoeffizienten des $FeCO$ Die in der Zeiteinheit photochemisch zerfallende $FeCO$-Menge setzen wir der Zahl der von $FeCO$ absorbierten Quanten proportional und erhalten dann[1] statt (4)

$$-\frac{dFeCO}{dt} = z \cdot FeCO + \frac{z'\alpha i}{h\nu} \cdot FeCO - b \cdot Fe\ CO \tag{4a}$$

Im stationären Zustand ist der Differentialquotient nach der Zeit Null, also

$$\frac{FeCO}{Fe \cdot CO} = \frac{b}{z + z'\frac{\alpha i}{h\nu}} = k'_{CO} \tag{6a}$$

An Stelle von (6) tritt so (6a), während Gleichung (5a) unverändert bleibt,

$$\frac{FeO_2}{Fe\ O_2} = \frac{B}{Z + Z'} = k'_{O_2} \tag{5a}$$

Dividieren wir (5a) durch (6a), so erhalten wir die Verteilungsgleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z + z'\frac{\alpha i}{h\nu}}{b} = k_{hell} \tag{9}$$

die für $i = 0$ übergeht in

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z}{b} = k_{dunkel} \,. \tag{8}$$

[1] $h\nu$ = Energie des Lichtquantums für Licht der Frequenz ν.

Ein Vergleich von (9) und (8) lehrt, daß die Konstante der Verteilungsgleichung bei Bestrahlung großer wird, und zwar ist k_{hell}

$$\frac{z + z' \frac{\alpha i}{h\nu}}{z} \text{ mal}$$

großer als k_{dunkel}.

Experimentell von Bedeutung ist die Größe

$$\Delta k = k_{\text{hell}} - k_{\text{dunkel}},$$

nach (8) und (9)

$$\Delta k = \frac{B}{Z + Z'} \cdot \frac{z' \frac{\alpha i}{h\nu}}{b}. \tag{10}$$

Aus (10) folgt fur konstantes ν

$$\frac{\Delta k_1}{\Delta k_2} = \frac{i_1}{i_2} \tag{11}$$

und fur konstantes i

$$\frac{\Delta k_1}{\Delta k_2} = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \cdot \frac{\nu_2}{\nu_1}, \tag{12}$$

zwei einfache Beziehungen, von denen sich (11) zur Prufung der Theorie eignet, (12) zur Bestimmung der Lichtabsorptionskurve des FeCO

2. Berechnung des Quotienten $FeO_2/FeCO$ aus der Atmungshemmung.

Da die normale Atmung bis herab zu sehr niedrigen Sauerstoffdrucken unabhangig vom Sauerstoffdruck ist, so verlauft die Bildung des FeO_2 schnell gegen den Verbrauch an FeO_2, und im stationaren Zustande liegt fast das gesamte Ferment als FeO_2 vor In Kohlenoxyd kommt FeCO hinzu, so daß wir zwei Formen des Atmungsferments haben, FeO_2 und FeCO. Die reduzierte Form Fe ist in Kohlenoxyd a fortiori zu vernachlassigen, da die Atmung in Kohlenoxyd kleiner ist

Sinkt in Kohlenoxyd die Atmung von A_0 auf A, so wollen wir

$$\frac{A}{A_0} = n \tag{13}$$

als den Atmungsrest und

$$\frac{A_0 - A}{A_0} = 1 - n \tag{14}$$

als die Atmungshemmung bezeichnen

Nehmen wir an, daß der Atmungsrest zur Atmungshemmung im Verhaltnis der beiden Formen des Atmungsferments steht, so haben wir

$$\frac{FeO_2}{FeCO} = \frac{n}{1-n}, \tag{15}$$

und die Verteilungsgleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = k$$

erhalt die Form

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k. \tag{16}$$

Hier sind alle Größen der linken Seite experimentell bestimmbar, n durch Atmungsmessung, CO und O_2 durch Gasanalyse

Verallgemeinerung. Die Atmung erreicht in der Regel bei kleinen Konzentrationen an verbrennlicher Substanz ein Maximum, das durch Zusatz von verbrennlicher Substanz nicht überschritten werden kann. Dann sind die Oberflachen in der Zelle mit verbrennlicher Substanz gesattigt Offenbar ist der Ansatz (15) nur fur „gesättigte" Zellen gültig. In ungesattigten Zellen liegt ein Teil des Atmungsferments brach, und bindet man diesen Teil an Kohlenoxyd, so wird die Atmung nicht gehemmt

Unter Sattigungsgrad verstehe ich den Bruchteil ε der maximalen Atmung fur eine bestimmte Substanz Ist beispielsweise die Hefeatmung bei der niedrigen Zuckerkonzentration c gleich 1 und steigt sie bei Zuckerzusatz maximal bis auf 15, so ist bei der Zuckerkonzentration c der Sattigungsgrad $\varepsilon = 1/15$ Dann sind die speziellen Gleichungen (15) und (16) durch die allgemeineren Gleichungen

$$\frac{FeO_2}{FeCO} = \frac{\varepsilon n}{1-\varepsilon n} \tag{15a}$$

$$\frac{\varepsilon n}{1-\varepsilon n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \tag{16a}$$

zu ersetzen, in denen also n der Atmungsrest von Zellen ist deren Sattigungsgrad ε betragt Fur $\varepsilon = 1$ gehen die allgemeinen Gleichungen wieder in die speziellen uber

3. k_L und k_G.

In der Gleichung

$$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = k$$

heben sich die Dimensionen der Größen heraus, so daß es gleichgültig ist, welche Einheiten man wählt und ob man CO und O_2 in Drucken oder Vol.-Prozenten ausdrückt.

Doch ist es nicht gleichgültig, ob man unter CO/O_2 das Verhältnis der Gase im Gasraum oder in der Lösung versteht, wegen der verschiedenen Löslichkeit des Kohlenoxyds und Sauerstoffs. Es ist, wenn α_{CO} und α_{O_2} die Absorptionskoeffizienten für Kohlenoxyd und Sauerstoff bedeuten

$$\left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Lösung}} = \left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Gasraum}} \frac{\alpha_{CO}}{\alpha_{O_2}}$$

und für 20°

$$\left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Lösung}} = \left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Gasraum}} \cdot 0{,}75.$$

Je nachdem man also unter CO/O_2 das Verhältnis der Gase im Gasraum oder in der Lösung versteht, erhält man verschiedene Zahlenwerte für k. Wir unterscheiden sie als k_L und k_G. Für 20° ist

$$k_L = 0.75 \cdot k_G.$$

Wir benutzen im allgemeinen k_G, weil die Analyse $(CO/O_2)_{\text{Gasraum}}$ liefert und α_{CO}/α_{O_2} für die Zellflüssigkeit nicht sicher bekannt ist. Die physikalische Bedeutung von k_G ergibt sich, wenn wir in der Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k_G.$$

$n = 0{,}5$ setzen. Dann wird $\frac{n}{1-n} = 1$. k_G ist also dasjenige Verhältnis der Gase im Gasraum, das eine Atmungshemmung von 50% bewirkt.

4. Einige Eigenschaften der Verteilungsgleichung.

Die Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \tag{16}$$

nach n aufgelöst, ergibt

$$n = \frac{k\frac{O_2}{CO}}{1 + k\frac{O_2}{CO}}, \tag{17}$$

und nach $1 - n$ aufgelost

$$1 - n = \frac{\frac{CO}{O_2}}{\frac{CO}{O_2} + k}. \tag{18}$$

Die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung ist also bestimmt durch das Verhaltnis CO/O_2 und eine Konstante. Verdunnen wir ein Kohlenoxyd-Sauerstoffgemisch beliebig mit einem indifferenten Gas, z. B. Wasserstoff oder Stickstoff, so andert sich die Wirkung auf die Atmung nicht[1].

Ist $CO/O_2 = k$, so wird $1 - n = 0{,}5$, die Atmungshemmung also 50%. Ist CO/O_2 groß gegen k, so wird $1 - n = 1$, die Atmungshemmung also vollstandig.

In Abb. 1 ist die Atmungshemmung $1 - n$ als Funktion von CO/O_2 aufgetragen, und zwar fur drei verschiedene Werte von k. Wie man sieht, ist die Atmungshemmung für einen gegebenen Wert von CO/O_2 um so großer, je kleiner k ist. Ein kleines k bedeutet also eine hohe Empfindlichkeit der Atmung gegen Kohlenoxyd und umgekehrt.

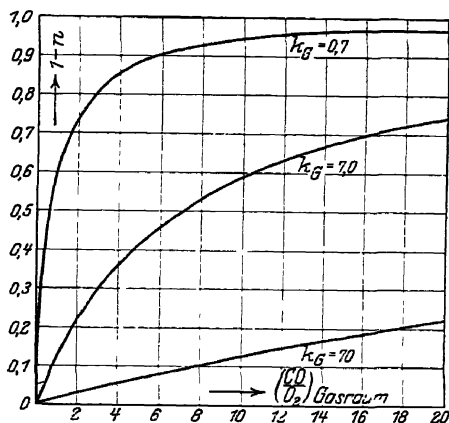



Abb. 1

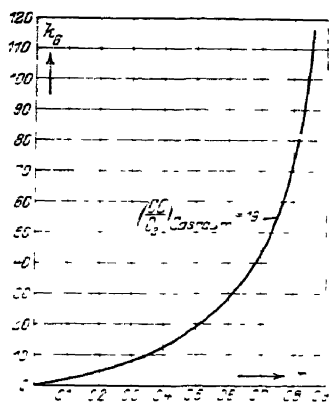



Abb. 2

In Abb. 2 ist k als Funktion von n fur $CO/O_2 = 19$ aufgetragen. Die Funktion ist für photochemische Versuche wichtig, bei denen man CO/O_2 konstant halt, Δn mißt und Δk aus Δn berechnet. dk/dn wachst sehr stark mit n.

---

[1] Falls der Sauerstoffdruck nicht so niedrig wird, daß in den Zellen Sauerstoffmangel entsteht.

5. Affinitäten des Atmungsferments.

Ist die Atmung Null, so ist k_L der Verteilungsgleichung das Verhaltnis der Affinitäten des Sauerstoffs und des Kohlenoxyds zu dem Atmungsferment. Ist die Atmung nicht Null, so ist k_L der Minimalwert dieses Verhältnisses Doch gibt k_L keine Auskunft uber den absoluten Wert der Affinitaten.

Da die absoluten Werte von fundamentaler Bedeutung sind, so ist folgende Rechnung von Interesse

Die Atmung der Hefe andert sich nicht merklich[1], wenn wir mit dem Sauerstoffdruck von einer Atmosphare auf 0,02 Atmospharen heruntergehen. Rechnen wir mit einem Fehler von 2 % bei der Atmungsmessung, so ist, wenn wir mit n den Atmungsrest und mit p_{O_2} den Sauerstoffdruck bezeichnen,

$$\frac{Fe\,O_2}{Fe\;p_{O_2}} = k_{O_2}, \tag{19}$$

$$\frac{n}{(1-n)\cdot p_{O_2}} = k_{O_2}$$

Fur $n = 0{,}98$ und $p_{O_2} = 0{,}02$ Atmospharen

$$\frac{0{,}98}{(1-0{,}98)\cdot 0{,}02} = 2500.$$

Messen wir also den Sauerstoffdruck in Atmospharen, so ist 2500 der Minimalwert der Affinitat des Sauerstoffs zu dem Atmungsferment Bei einem Sauerstoffdruck von $^1/_{2500}$ Atmospharen ist die Sauerstoffverbindung des Atmungsferments hochstens zur Halfte dissoziiert $k_{O_2} \geqq 2500$

Da $k \leqq k_{O_2}/k_{CO}$ ist, so konnen wir auch fur k_{CO} eine Grenze angeben Setzen wir $k = 9$ (vgl Abschnitt 8), so wird $k_{CO} = 280$ Bei einem Kohlenoxyddruck von $^1/_{280}$ Atmospharen ist die Kohlenoxydverbindung des Atmungsferments hochstens zur Halfte dissoziiert

Anmerkungen zu 1 bis 5

Obwohl die Atmung eine Reaktion an Oberflächen ist, setzen wir die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional den vorhandenen Massen an Ferment Wir lassen also sämtliche Fermentmolekule gleichartig reagieren und unterscheiden nicht unlösliches, nichtreagierendes von löslichem, reagierendem Ferment. Dann ist es gleichgültig, ob die Fermentmolekule freibeweglich in Lösung oder fest in die Oberflächen eingelagert sind

---

[1] Vgl. Abschnitt 12

k_L der Verteilungsgleichung enthalt einen Faktor x, der von der Adsorption des Kohlenoxyds und Sauerstoffs an den Oberflächen herruhrt Denn es ist

$$\left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Lösung}} = x \cdot \left(\frac{CO}{O_2}\right)_{\text{Oberfläche.}}$$

Aus der Konstanz von k folgt, daß x unabhängig von CO/O_2 ist, daß also hier die FREUNDLICHsche Adsorptionsisotherme nicht gilt.

Löst man das Atmungsferment von den Oberflächen ab, so wird sich x und damit k ändern. Die Atmung intakter Zellen und die Atmung von Zellextrakten wird also verschieden empfindlich gegen Kohlenoxyd sein.

6. Hefe in Glucose-Phosphat.

In Phosphatlosung, die 1% Glucose enthalt, sind Hefezellen mit Glucose gesattigt ($\varepsilon = 1$) In diesem Falle ist die einfache Formel

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \tag{16}$$

anzuwenden.

Tabelle 1.

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4, m/18 Gucose. Dunkel.

Nr	Temperatur °C	Gasmischung in Vol.-% CO	O_2	Hemmung d Atmung in %		k_G	
1	20	80,1	19,9	35		7,5	(a)
		88,6	11,4	61	ber 51	5,0	(b)
2	37,5	80,7	19,3	38		6,8	(a)
		87,7	12,3	60	ber 51	4,8	(b)
3	37,5	78	22	22		13	(a)
		90,6	9,4	55	ber 43	8	(b)
4	20	78,8	21,2	24		12	(a)
		79,0	4,4	72	ber 60	7	(b)
5	37,5	76,8	23,2	34		6,5	(a)
		74,7	5,3	77	ber 69	4,3	(b)
6	37,5	80	20	36		7,2	(a)
		80	4,4	74	ber 72	6,4	(b)

Tabelle 1 enthalt das Ergebnis von sechs Versuchen nach Daten der ersten Arbeit[1] Jeder Versuch besteht aus einem Paar von Messungen, a und b, bei zwei verschiedenen Werten von CO/O_2 In dem b-Versuch ist CO/O_2 immer großer und auch, in Ubereinstimmung mit der Theorie, die Atmungshemmung Doch sieht man aus der letzten Spalte der Tabelle, daß k nicht konstant ist, sondern kleiner wird,

[1] O. WARBURG: Diese Zeitschr. 177, 471. 1926; der dort beschriebenen Versuchsanordnung habe ich nichts hinzuzufugen.

wenn die Atmungshemmung zunimmt. Ich habe aus dem k des a-Versuchs die Hemmung für den b-Versuch nach Gleichung (16) berechnet und in Kleindruck den experimentell gefundenen Hemmungen beigefügt. Der Abfall der k-Werte bedeutet, daß die gefundene Atmungshemmung rund 10% zu groß ist. Die Abweichung von der Theorie ist systematisch und außerhalb der Fehlergrenzen der Messungen.

Immerhin sind die Abweichungen nicht sehr groß. Man hat den Eindruck, daß die Theorie im Prinzip stimmt und daß die Abweichungen von irgendwelchen Störungen herrühren. In erster Linie war dabei an die Gärung zu denken, die zunimmt, wenn die Atmung abnimmt. Zellen, die verschieden stark gären, sind nicht unter gleichen inneren Bedingungen, die bei der Ableitung der Gleichungen vorausgesetzt wurden.

Um Störungen durch die Gärung zu vermeiden, habe ich den Zucker der Phosphatlösung durch andere verbrennliche Substanzen, wie Äthylalkohol oder Essigsäure ersetzt, ohne im übrigen die Versuchsanordnung wesentlich zu ändern.

7. Hefe in Alkoholphosphat.

In Phosphatlösung, die 1% Äthylalkohol oder 0,06% Essigsäure enthält, sind Hefezellen gesättigt ($\varepsilon = 1$). Auch in diesem Falle ist also die einfache Formel

$$\frac{n}{1-n} \; \frac{CO}{O_2} = k \qquad (16)$$

anzuwenden.

Die Hefesuspensionen wurden in alkohol- oder essigsäurehaltiger Phosphaltösung einige Stunden vor Beginn der Hemmungsversuche mit Luft geschüttelt, um das Maximum der Atmung zu haben, das nicht immer sofort bei Zusatz der verbrennlichen Substanz da ist. Tabelle 2 enthält ein Versuchsbeispiel mit allen experimentellen Einzelheiten, Tabelle 3 das Ergebnis von fünf Versuchen. Die k-Werte der a- und b-Versuche stimmen so gut überein, als dies bei der Genauigkeit der Messungen möglich ist. Am schlechtesten stimmen sie in Versuch 1. Berechnen wir für diesen Versuch aus a die Atmungshemmung für b, so ergibt sich 63 gegen 66%, eine Differenz, die in den Grenzen der Meßfehler liegt.

Das Ergebnis ist, daß die Abweichungen von der Theorie verschwinden, wenn man den Zucker durch Alkohol oder Essigsäure ersetzt. Mögen die Abweichungen in Zucker nun mit der Gärung zusammenhängen oder nicht, jedenfalls ist durch die Alkoholversuche

Tabelle 2.

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4, m/5 Äthylalkohol. 20°. Dunkel

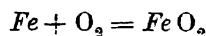
	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4
Einsatz	0,3 ccm KOH	0,3 ccm KOH	0,3 ccm KOH	0,3 ccm KOH
Hauptraum	2 ccm Hefesusp mit 8 cmm Hefe	2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe	2 ccm Hefesusp mit 8 cmm Hefe	2 ccm Hefesusp. mit 8 cmm Hefe
Volumina in ccm . .	v_F 2,3 v_G 13,07	v_F 2,3 v_G 13,89	v_F 2,3 v_G 13,65	v_F 2,3 v_G 13,88
Gefäßkonstanten in qmm	$k_{O_2} = 1,23$	$k_{O_2} = 1,30$	$k_{O_2} = 1,28$	$k_{O_2} = 1,30$
Gasraum. . .	Luft	Luft	Luft	Luft
	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
Nach 10 Min . .	—16 19,6	—14,5 18,8	—15,0 19,2	—14,5 18,8
Nach 3 Std. Schutteln 20 Min.	—43 53	—41 53	—41 52,7	—40 52
	↓	↓	↓	↓
Gasraum . .	Luft	18% O_2, 82% CO	5% O_2, 95% N_2	5,8% O_2, 94,2% CO
	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
↓ 10 Min . .	—19,5	—13	—19	—7
20 Min . .	—39 48	—25,5 33,2	—38 48,6	—14 18,2
		n = 0,693		n = 0,38

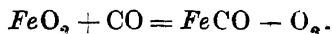
Tabelle 3

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4 mit Alkohol oder Essigsäure. Dunkel

Nr	Verbrennliche Substanz	Gasmischung in Vol.-%		Hemmung der Atmung in %	k_G
		CO	O_2		
1	Äthylalkohol 0,22 mol	81	19	29	10,4 (a)
		94,7	5,3	66	9,3 (b)
2	„	60	6,8	54	7,6 (a)
		89,4	10,6	54	7,2 (b)
3	„	40,1	4,4	55	7,5 (a)
		88,6	11,4	50	7,[illegible] (b)
4	„	82	18	31	10 (a)
		94,2	5,8	62	9,9 (b)
5	Essigsaure 0,01 mol	90	10	47	10 (a)
		95	5	65	10 (b)

die Verteilungstheorie verifiziert Die Primarreaktion der Atmung ist

$$Fe + O_2 = FeO_2$$

und die Gleichung der Kohlenoxydwirkung

$$FeO_2 + CO = FeCO + O_2.$$

Der Zahlenwert der Konstanten k_G ist im Mittel 9. der Konstanten k_L im Mittel 7 Das Atmungsferment bindet also Sauerstoff mindestens siebenmal fester als Kohlenoxyd

Berechnen wir noch das Verhaltnis CO/O_2, das mit $k = 9$ notig ware, um die Atmung um 99% zu hemmen Es ergibt sich $CO/O_2 = 890$, ein Verhaltnis, das man zwar experimentell erzeugen, bei dem man aber die Atmung wegen des niedrigen Sauerstoffdruckes nicht mehr messen kann. Wird also die Atmung durch Kohlenoxyd nicht „vollstandig" gehemmt, so beruht dies nicht auf der Existenz von zwei verschiedenen Atmungsfermenten, sondern auf den Eigenschaften der Verteilungsgleichung.

8. Hefe in reinem Phosphat.

Backerhefe in reinem, von verbrennlicher Substanz freiem Phosphat ist ungesattigt ($\varepsilon < 1$). In diesem Falle ist die allgemeine Verteilungsgleichung

$$\frac{\varepsilon n}{1 - \varepsilon n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k \qquad (16\,a)$$

anzuwenden.

Backerhefe in reinem Phosphat atmet mit dem respiratorischen Quotienten 1, verbrennt also Zucker, der aus ihrer Substanz fur die Atmung mobilisiert wird. Um hier ε zu bestimmen, müssen wir die maximale Atmung durch Zusatz von Zucker (nicht etwa Alkohol oder Essigsaure) erzeugen. Ich finde die Atmung Q_{O_2} in reiner Phosphatlosung im Mittel gleich 5[1], und die Atmung in 1% Zucker, die maximal ist, im Mittel gleich 75 Der Sattigungsgrad ist also

$$\varepsilon = \frac{5}{75} = 0{,}067.$$

Wir berechnen mit $\varepsilon = 0{,}067$ und $k = 9$ das Verhaltnis CO/O_2, das notig ware, um die Atmung der ungesattigten Zellen um 70% zu hemmen, und finden nach Gleichung (16a) $CO/O_2 = 440$ gegenuber $CO/O_2 = 21$ für gesattigte Zellen

Wir berechnen ferner das Verhaltnis CO/O_2 fur die Bedingung $n = 1$

$$\frac{CO}{O_2} = k\,\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon}$$

und finden mit $\varepsilon = 0{,}067$ und $k = 9$ $CO/O_2 = 126$ Dies ist der Grenzwert von CO/O_2, uber den man hinausgehen muß, um in Zellen mit dem Sattigungsgrad $^1/_{15}$ eine Kohlenoxydwirkung zu erzeugen Da nun bei unserer Versuchsanordnung das Verhaltnis CO/O_2 höchstens 25 ist (96%

---

[1] $Q_{O_2} = \frac{\text{cmm } O_2}{\text{mg Hefe} \times \text{Stunden}}$, das Hefegewicht in Trockensubstanz ausgedruckt.

CO und 4% O_2), so folgt, daß Kohlenoxyd die Atmung der ungesättigten Zellen nicht hemmen wird Der Versuch ergab

Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4. 20°. Dunkel.

	95% N_2, 5% O_2 40 cmm Zellen: 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2	95% CO, 5% O_2 40 cmm Zellen. 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2
In 20 Min.	15,1	15,1
„ 20 „	13,9	13,2
„ 20 „	11,3	12,0
„ 40 „	19,5	20,2
In 100 Min.	59,8	60,5

Die Atmung, die in reiner Phosphatlösung langsam absinkt, wurde also in Übereinstimmung mit der Theorie durch 95% Kohlenoxyd nicht gehemmt —

Hefe in reiner Phosphatlosung ist nicht unter allen Umstanden ungesattigt, sondern es kommt darauf an, unter welchen Bedingungen die Hefe gezüchtet worden ist. Hefe aus Bierbrauereien hat wie Backerhefe in reiner Phosphatlosung eine geringe Atmung, die aber durch Zusatz von Zucker nicht wesentlich beschleunigt werden kann. Solche Hefe ist auch ohne Zusatz von Zucker gesattigt und sollte durch Kohlenoxyd gehemmt werden. Der Versuch ergab

Hefe der Berliner Hochschulbrauerei in m/20 KH_2PO_4. 20° Dunkel

	95% N_2, 5% O_2 100 cmm Zellen: 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2	95% CO, 5% O_2 100 cmm Zellen 2 ccm Sauerstoffverbrauch cmm O_2
In 5 Min	25	7
„ 5 „	21	5
„ 5 „	22	5

Die Atmung der Bierhefe wurde also in reinem Phosphat gehemmt und zwar ebenso stark, wie die Atmung der Backerhefe in Glucosephosphat

Anmerkungen zu S.

1. Bei der Anwendung der Gleichung (16a) haben wir mit $k = 9$ gerechnet und damit angenommen, daß die Verteilung des Atmungsferments zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff die gleiche ist, ob die Zellen gesättigt sind oder nicht Nach Gleichung (8) trifft diese Annahme nicht zu, sondern es ist wegen der kleineren Atmung k fur ungesättigte Zellen großer als fur gesättigte Zellen Wahrscheinlich macht diese Änderung von k wenig aus.

2. Ungesättigte Zellen sind nicht nur gegen Kohlenoxyd unempfindlicher, sondern auch gegen andere atmungshemmende Substanzen. Z. B. wurde für Blausäure gefunden:

Bäckerhefe, 20°. Gasraum Luft

In m/20 KH_2PO_4 ohne Glucose	In m/20 KH_2PO_4 mit m/18 Glucose
Atmungshemmung	Atmungshemmung
durch 10^{-5} n HCN: Null	durch 10^{-5} n HCN: 28%
durch 10^{-4} n HCN: Null	durch 10^{-4} n HCN: 80%
durch 10^{-3} n HCN 61%	durch 10^{-3} n HCN. 100%

3. R. Emerson[1] hat in diesem Laboratorium gefunden, daß die Atmung der Chlorella unter gewissen Bedingungen durch Kohlenoxyd und Blausäure gehemmt wird, unter anderen Bedingungen nicht Qualitativ ähnlich sind diese Erscheinungen bei Chlorella und Hefe quantitativ so verschieden, daß sie nicht nach dem gleichen Prinzip erklärt werden können

9. Wirkung des Lichtes.

Nach Daten der ersten Arbeit[2] sank die Atmungshemmung in 95% Kohlenoxyd und 5% Sauerstoff von 71 auf 14%, wenn Hefe in Glucosephosphat belichtet wurde. Wenden wir auf diesen Fall die Gleichungen (8) und (9) an und rechnen, weil der Sättigungsgrad 1 ist, mit der einfachen Gleichung

$$\frac{n}{1-n} \cdot \frac{CO}{O_2} = k,$$

so war $k_{\text{dunkel}} = 7{,}8$ und $k_{\text{hell}} = 116$ Die Belichtung wirkte, als ob die Affinität des Atmungsferments zu Kohlenoxyd auf $^1/_{15}$ des Dunkelwertes verkleinert würde Ist nun nach Abschnitt 6 der Minimalwert der Konstanten

$$k_{CO} = \frac{FeCO}{Fe\ p_{CO}} \tag{20}$$

im Dunkeln 280, so war er im hellen, bei der angewandten Lichtintensität 19

Bei der Bestrahlung von Hefe in Kohlenoxyd sind die Wellenlängen 436, 546 und 578 $\mu\mu$ photochemisch wirksam[2]. Das Atmungsferment ist eine gefärbte Substanz, deren Lichtabsorptionskurve nach Gleichung (12) bestimmt werden kann.

---

[1] Emerson, R.: Journ. General Physiol. 10, 469. 1927.
[2] Warburg, O: diese Zeitschr. 177, 471. 1926.

10. Andere Versuchsbedingungen und Objekte[1].

An Heferassen habe ich außer käuflichen Bäckerhefen und Bierhefen geprüft: Rasse M, Rasse XII, Rasse U und Torula utilis, alle vom Berliner Institut für Gärungsgewerbe; an Suspensionsflüssigkeiten außer Phosphat: Bierwürze, Citrat nach SOERENSEN (p_H 3), Glykokoll-Natronlauge nach SOERENSEN (p_H 10), die beiden letzteren mit 1% Alkohol. Immer fand ich, daß 95% Kohlenstoff und 5% Sauerstoff die Atmung im Dunkeln stark hemmte. Wie die Hefen, verhielt sich ein Staphylococcus albus. Nicht gehemmt wurde die Atmung der roten Vogelblutzellen, eine Ausnahme, die insofern interessant ist, als diese Zellen vorwiegend aus Hämoglobin bestehen, das bei dem Atmungsversuch in Kohlenoxydhämoglobin verwandelt war.

Bei Versuchen mit Geweben tritt die Schwierigkeit auf, daß der niedrige Sauerstoffdruck zur Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff nicht ausreicht. Man hat hier den Fall, daß die Objektdicke größer ist als die „Grenzschnittdicke“[2] und muß sich fragen, ob es unter solchen Umständen möglich ist, eine Atmungshemmung nachzuweisen.

Wir denken uns eine Gewebelamelle und bezeichnen mit

x_{O_2} den Sauerstoffverbrauch des Gewebes ohne Kohlenoxyd,
x'_{O_2} den Sauerstoffverbrauch des Gewebes mit Kohlenoxyd,
q_{O_2} den Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit Gewebe ohne Kohlenoxyd,
q'_{O_2} den Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit Gewebe mit Kohlenoxyd,
D die mittlere Dicke der Gewebelamelle,
d die Grenzschnittdicke ohne Kohlenoxyd,
d' die Grenzschnittdicke mit Kohlenoxyd.

Ist D größer als d und auch größer als d' und beziehen wir alle x- und q-Werte auf gleiche Zeiten, so ist

$$\frac{x'_{O_2}}{x_{O_2}} = \frac{q'_{O_2} \cdot d'}{q_{O_2} \cdot d}. \qquad (21)$$

Ist der Sauerstoffdruck in der umspülenden Lösung ohne und mit Kohlenoxyd gleich, so ist nach einer früher abgeleiteten Formel[3]

$$\frac{d'}{d} = \sqrt{\frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}} \qquad (22)$$

---

[1] Vgl. hierzu auch J. B. S. HALDANE, Nature 1927. — J. B. S. HALDANE fand, daß Kohlenoxyd-Sauerstoffgemische, die nach meinen Hefeversuchen die Atmung hemmen, auf Galleria mellonella und Lepidium sativum lähmend wirken (Bewegung, Keimung).

[2] WARBURG, O.: diese Zeitschr. 142, 317. 1923.

[3] Diese Zeitschr. 142, 317. 1923.

Tabelle 4: *Gewebe in 5% CO_2, 10% O_2, 85% CO.*

Gewebe . . .	Leber (Ratte)	Chorion (Ratte)	Retina (Ratte)	Embryo (Ratte)	Embryo (Huhn)	Jensen-Sarkom (Ratte)
Trockengewicht	14 mg (Schnitt)	9,3 mg	3,4 mg (2 Häute)	2,3 mg (3 Embryonen)	2,6 mg (4 Embryonen)	4,6 mg (Schnitt)
Medium	Serum	Serum	Ringer, 0,2% Glucose	Serum	Ringer, 0,2% Glucose	Ringer, 0,2% Glucose
Gefäßvolumina in ccm	v_F 7 v_G 6,8	v_F 3 v_G 10,4	v_F 3 v_G 10,8	v_F 3 v_G 10,6	v_F 3 v_G 10,8	v_F 3 v_G 10,5
Temperatur . .	25°	37,5°	37,5°	37,5°	37,5°	25°
Druckanderung	mm	mm	mm	mm	mm	mm
h bedeutet hell	(20′ d − 8)	20′ d + 43	20′ d + 73	30′ d + 9	40′ d + 13	30′ h + 5,5
(75 Watt-Lampe	20 h − 11	20 h + 23	20 h + 56	30 h + 7,5	40 h + 10	30 d + 7,5
4 cm)	20 d − 4,5	20 d + 38	20 d + 71	30 d + 8,5	40 d + 14,5	30 h + 4,5
d bedeutet dunkel	20 h − 11	20 h + 23	20 h + 47	30 h + 6,0	40 h + 12	30 d + 7,5
	20 d − 5					
	↓	↓	↓	↓		
	5% CO_2 95% O_2 20′ − 32	5% CO_2, 95% O_2 20′ − 10	5% CO_2, 95%, O_2 20′ + 35	5% CO_2, 95% O_2 30′ − 0,5	5% CO_2, 95% O_2 40′ . 0	
		↓	↓	↓		
		5% CO_2, 10% O_2, 85% N_2 20′ + 15	5% CO_2, 10% O_2, 85% N_2 20′ + 46	5% CO_2, 10% O_2, 85% N_2 30′ + 5,5		

(22) in (21) eingesetzt, ergibt

$$\frac{x'_{O_2}}{x_{O_2}} = \sqrt{\frac{q'_{O_2}}{q_{O_2}}}, \quad (23)$$

das heißt, die verbrauchten Sauerstoffmengen verhalten sich wie die Wurzeln aus den Atmungsgroßen.

Es zeigt sich also, daß eine etwa vorhandene Atmungshemmung teilweise, aber nicht vollstandig verdeckt wird Sie wird teilweise verdeckt, weil sich um so mehr Gewebe an der Atmung beteiligt, je kleiner der Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit ist Die Atmungshemmung wird nicht vollstandig verdeckt, weil die Gewebemenge, die atmet, nicht in demselben Maße zunimmt, als der Sauerstoffverbrauch der Gewichtseinheit abnimmt

Es ist nicht $\frac{d'}{d} = \frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}$,

sondern $\frac{d'}{d} = \sqrt{\frac{q_{O_2}}{q'_{O_2}}}$.

Bei der Ausfuhrung der Versuche empfiehlt es sich, mit und ohne Kohlenoxyd dieselbe Gewebelamelle zu benutzen, also die Gas-

gemische hintereinander auf dasselbe Objekt einwirken zu lassen. Anstatt die Gasgemische auszuwechseln, ist es bequemer, abwechselnd zu belichten und zu verdunkeln. Hinreichend starke Belichtung wirkt ja wie ein Ersatz des Kohlenoxyds durch ein indifferentes Gas. Hat man ferner Zellen, die gären, so ist es einfacher, statt der Wirkung auf die Atmung die Wirkung auf die Gärung zu messen.

Tabelle 4 ist eine Zusammenstellung der Versuche. Das Verhältnis CO/O_2 war bei allen Versuchen gleich, nämlich 8,5. Große Wirkungen wurden gefunden für Leber, Chorion und Netzhaut, kleinere für Embryonen und ein Sarkom der Ratte, keine Wirkung (in der Tabelle nicht angeführt) für ein Sarkom[1] des Huhns.

Das Ergebnis ist, daß das Atmungsferment nicht nur in Hefe, sondern sehr allgemein mit Kohlenoxyd reagiert, und daß die hierbei entstehende Verbindung nicht nur in Hefe, sondern sehr allgemein durch Licht gespalten wird.

11. Verwandtschaft des Atmungsferments mit dem Hämoglobin.

Hämoglobin (Hb) verteilt sich zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd nach der Gleichung

$$\frac{HbO_2}{HbCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = K. \tag{24}$$

Kohlenoxydhämoglobin wird, wie JOHN HALDANE 1897 fand[2], bei Belichtung gespalten, während Oxyhämoglobin im Lichte beständig ist. Deshalb nimmt K der Gleichung (24) bei Belichtung zu

$$K_{\text{hell}} > K_{\text{dunkel}} \tag{25}$$

Die Ausdrücke (24) und (25) fassen eine Reihe sehr spezieller Eigenschaften des Hämoglobins zusammen, die nach dem Vorhergehenden auch Eigenschaften des Atmungsferments sind. Aus der Häufung gleicher und ganz spezieller Eigenschaften, die hier vorliegt, folgt, daß das Atmungsferment eine Eisenpyrrolverbindung ist, in der das Eisen wie im Hämoglobin an Stickstoff gebunden ist. Es war kein Zufall, daß das an Stickstoff gebundene Eisen der Blutkohlen Reaktionen zeigte[3], die charakteristisch für das Atmungsferment sind.

Bedenkt man, daß Kohlenoxyd bei gewöhnlicher Temperatur ein chemisch fast indifferentes Gas ist, so bedarf der Schluß, daß

---

[1] ROUS-Sarkom.

[2] HALDANE u. SMITH: Journ. of Physiol. **20**, 497. 1896. — HARTRIDGE u. ROUGHTON: Proced. Roy. Soc. B **94**, 336. 1923.

[3] WARBURG u. BREFELD: diese Zeitschr. **145**, 461. 1924.

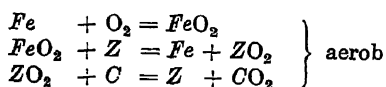
Atmungsferment und Hamoglobin verwandt sind, keiner naheren Begründung. Notwendiger erscheint es zu begrunden, warum Atmungsferment und Hämoglobin nur verwandt und nicht identisch sind. Es genugen dazu die folgenden vier Zahlen[1]:

Atmungsferment der Hefe	Hämoglobin
$\frac{FeO_2}{FeCO} \cdot \frac{CO}{O_2} = 9$	$\frac{HbO_2}{HbCO} \cdot \frac{CO}{O_2} \sim 0{,}01$
$\frac{FeO_2}{Fe \cdot p_{O_2}} \geqq 2500$	$\frac{HbO_2}{Hb \cdot p_{O_2}} \sim 50$

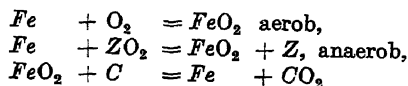
Eine mit dem Hamoglobin verwandte Substanz, die weit verbreitet in Zellen vorkommt, ist das KEILINsche Cytochrom[2]. Auch Cytochrom ist nicht identisch mit dem Atmungsferment Denn Cytochrom reagiert nicht mit Kohlenoxyd[3].

Es ist merkwurdig, daß Kohlenoxyd, obwohl es nicht mit dem Cytochrom reagiert, die Oxydation des Cytochroms an der Luft verhindert. Dem Anschein zum Trotz ist Cytochrom nicht autoxydabel, sondern es ist der aktivierte Sauerstoff des Atmungsferments, der das Cytochrom in der Zelle oxydiert.

Was die Funktion dieser interessanten Substanz anbetrifft, so gibt es zwei Moglichkeiten, zwischen denen man so lange nicht entscheiden wird, als es keine Methoden gibt, um das Eisen des Cytochroms und das Eisen des Atmungsferments zu bestimmen Bezeichnen wir die Reduktionsform des Cytochroms mit Z, seine Oxydationsform mit ZO_2 — ohne damit uber die Wertigkeit des Eisens in ZO_2 etwas aussagen zu wollen — und die verbrennende Substanz mit C, so ist die erste Moglichkeit

$$\left.\begin{aligned} Fe + O_2 &= FeO_2 \\ FeO_2 + Z &= Fe + ZO_2 \\ ZO_2 + C &= Z + CO_2 \end{aligned}\right\} \text{aerob}$$

Dann ware das Cytochrom eine „Peroxydase" und als solche ein Bestandteil des Atmungsferments im weiteren Sinne.

Die zweite Möglichkeit ist

$$\begin{aligned} Fe + O_2 &= FeO_2 \quad \text{aerob,} \\ Fe + ZO_2 &= FeO_2 + Z, \quad \text{anaerob,} \\ FeO_2 + C &= Fe + CO_2 \end{aligned}$$

Dann ware das Cytochrom kein Teil des Atmungsferments, sondern wurde in der Zelle dieselbe Rolle spielen, wie das Hämoglobin außerhalb der Zelle.

---

[1] p_{O_2} ist in Atmosphären ausgedruckt.

[2] KEILIN, D: Proc Roy. Soc London, B, 98, 312. 1925; 100, 129. 1926.

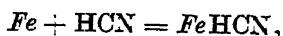
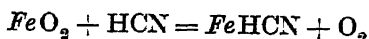
[3] WARBURG, O. Naturwissenschaften 15, H. 26. 1927 (Vortrag in der Royal Society vom 12. Mai 1927). KEILIN, D.: Le Cytochrome. Paris 1927 (Vortrag in der Société de biologie vom 27. Mai 1927).

12. Blausäurewirkung bei verschiedenen Sauerstoffdrucken.

Wurde die Blausaure, wie das Kohlenoxyd, mit der reduzierten Form des Atmungsferments reagieren, so wäre die Primarreaktion der Blausàurewirkung

$$Fe + HCN = Fe HCN,$$

die Bilanzgleichung

$$Fe O_2 + HCN = Fe HCN + O_2$$

und das Gleichgewicht

$$\frac{Fe O_2}{Fe(HCN)} \cdot \frac{HCN}{O_2} = K$$

und die Blausaurewirkung müßte in gleichem Maße von dem Sauerstoffdruck abhangig sein, wie die Kohlenoxydwirkung.

Versuchsanordnung.

Das Versuchsobjekt war Backerhefe, suspendiert in m 20 KH_2PO_4 und m/100 Essigsaure, die Suspension zur Herstellung stationarer Verhaltnisse vor dem Versuch 2 Stunden mit Luft geschuttelt. Der Sauerstoffdruck wurde zwischen einer Atmosphäre und $^1/_{30}$ Atmosphare variiert, die Blausaure war $1,5 \cdot 10^{-4}$ n.

Bei allen Versuchen mit niedrigen Sauerstoffdrucken ist die Gefahr, daß Sauerstoffmangel in den Zellen entsteht, wodurch Wirkungen vorgetäuscht werden. Die Zellsuspensionen mussen so dunn wie möglich, die Suspensionsvolumina so klein wie moglich sein. Man muß sehr schnell schutteln und darf nicht, wie es sonst ublich ist, wahrend des Ablesens anhalten Endlich mussen die Versuchszeiten so kurz sein, daß die Destillation der Blausäure in den Kalilaugeeinsatz die Konzentration der Blausaure im Hauptraum nicht merklich vermindert Die Anordnung ohne Kalilaugeeinsatz, mit der wir im allgemeinen die Blausäurewirkung messen, war bei niedrigen Sauerstoffdrucken wegen der zu großen Flussigkeitsvolumina unzweckmäßig.

Tabelle 5 enthalt ein Versuchsbeispiel A_0, die Atmung ohne Blausaure, ist zwischen 2,9 und 97 Vol.-% Sauerstoff gleich A, die Atmung in $1,5 \cdot 10^{-4}$ n Blausaure, betragt bei allen vier Sauerstoffdrucken rund 40% von A_0, d. h., die Blausaurewirkung ist in den gepruften Grenzen unabhangig vom Sauerstoffdruck.

Es geht daraus hervor, daß die Blausaure nicht mit der reduzierten Form des Atmungsferments reagiert, wenn sie die Atmung hemmt. Bemerkenswerterweise ist auch das zweiwertige Eisen des Hamoglobins unempfindlich gegen Blausäure Oxydiert man aber das Hamoglobin zu Methamoglobin, so tritt eine starke Affinitat zu Blausaure auf Methämoglobin reagiert, im Gegensatz zu Hamoglobin und Oxyhamo-

globin, mit Blausaurekonzentrationen, wie sie fur die Atmungshemmung in Betracht kommen.

Tabelle 5 *Bäckerhefe in m/20 KH_2PO_4, m/100 Essigsäure 20°.*

Gasraum	2,5 Vol.-% O_2	5,2 Vol.-% O_2	21 Vol.-% O_2	97 Vol.-% (Rest-N_2)
Hauptraum	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 5 cmm Zellen	1 ccm Suspension 0,5 cmm Zellen
Einsatz	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH	0,5 ccm KOH
Volumina in ccm	v_F 1,5 v_G 15,27	v_F 1,5 v_G 15,25	v_F 1,5 v_G 14,77	v_F 1,5 v_G 15,13
Gefäßkonst in qmm	k_{O_2} = 1,43	k_{O_2} = 1,43	k_{O_2} = 1,38	k_{O_2} = 1,42
Nach 30 Min.	—24,5 mm	—25,0 mm	—25,0 mm	—25,0 mm
A^0 =	35 cmm	35,7 cmm	34,5 cmm	35,5 cmm
	↓ 1,5·10⁻⁴n HCN	↓ 1,5·10⁻⁴n HCN	↓ 1,5·10⁻⁴n HCN	↓ 1,5·10⁻⁴n HCN
Nach 30 Min.	—11,0 mm	— 9,5 mm	—10,5 mm	—11,5 mm
A =	15,8 cmm	13,6 cmm	14,5 cmm	16,3 cmm
$\frac{A}{A_0}$ =	0,45	0,39	0,41	0,46

13. Absorptionskoeffizient der Blausäure.

Fur viele Versuche mit Blausaure ist die Kenntnis des Blausauredampfdrucks wichtig. Eine einfache Bestimmungsmethode ist folgende.

In die Birne eines kegelförmigen Gefäßes[1] bringt man titrierte Kaliumcyanidlosung, in den Hauptraum eine Säurelosung, deren Säure genugen muß, um die Blausäure aus dem Kaliumcyanid in Freiheit zu setzen Man hangt in den Thermostaten ein, gleicht Temperatur und Druck aus, gibt dann den Inhalt der Birne in den Hauptraum und schuttelt, bis der positive Druck nicht mehr zunimmt Zu beachten ist, daß das Kaliumcyanid frei von Kohlensaure ist, was durch Zusatz von Bariumchlorid und Zentrifugieren leicht erreicht wird

Ist x die Blausäuremenge in der Birne in Kubikmillimetern, H der entstandene Druck und P_0 der Normaldruck der Sperrflussigkeit, α der Absorptionskoeffizient der Blausäure, T die absolute Versuchstemperatur, v_G das Volumen des Gasraums und v_F das Volumen der Flussigkeit im Meßgefäß, so ist

$$x = \frac{H}{P_0}\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha\right) \qquad (26)$$

Beim Versuch war die Säurelösung im Hauptraum m/2 KH_2PO_4, die Kaliumcyanidlosung in der Birne war n/10, ferner

$$x = 4480 \text{ cmm} \quad v_F = 2200 \text{ cmm} \quad v_G = 13600 \text{ cmm}$$
$$H = -83 \text{ mm} \quad P_0 = 10000 \text{ mm}$$
$$T = 293^0$$

woraus nach (26) folgt

$$\alpha = 240$$

[1] Form vgl Abb 1, diese Zeitschr. 177, 471 1926

Kennt man α, so kann man für beliebige Gas- und Flüssigkeitsvolumina den Partialdruck H der Blausäure berechnen, der entsteht, wenn in ein Gefäß x cmm Blausäure hineingebracht werden

$$H = P_0 \cdot \frac{x}{v_G \frac{273}{T} - v_F \alpha}. \tag{26a}$$

Im allgemeinen ist v_G klein gegen $v_F \alpha$, so daß (26a) übergeht in

$$H = P_0 \cdot \frac{x}{v_F \alpha}. \tag{26b}$$

Dann ist H unabhängig vom Volumen des Gasraums.

Bei dem in Tabelle 5 wiedergegebenen Versuch war der Dampfdruck der Blausäure, nach Gleichung (26b) berechnet, 0,14 mm. Man sieht daraus, daß Änderungen des Blausäuredrucks manometrisch ganz zu vernachlässigen waren.

14. Schwermetall in gärenden Zellen.

Die Bildung dissoziierender Blausäure- und Schwefelwasserstoffverbindungen ist eine dem Atmungs- und Gärungsferment gemeinsame Eigenschaft[1]. Ist nun die Schwermetalltheorie der Atmung bewiesen, so ist es im Prinzip auch die Schwermetalltheorie der Gärung. Verstehen wir unter dem Gärungsferment mit PASTEUR die Substanz, die den Sauerstoff innerhalb der Moleküle bei der Gärung verschiebt, so ist die energieliefernde chemische Reaktion der lebendigen Substanz allgemein eine Sauerstoffübertragung durch Schwermetall, in der Atmung eine Übertragung von freiem, in der Gärung eine Übertragung von gebundenem Sauerstoff.

Die Theorie verlangt, daß überall da, wo Gärung ist, Schwermetall ist. Zur Prüfung eignen sich Hefen, die stark gären und schwach atmen. Wir vergleichen sie mit Hefen, die schwach gären und stark atmen, und züchten beide Hefen in demselben Nährboden. Dabei zeigt sich folgendes:

Rasse U, anaerob gezüchtet	Torula utilis, aerob gezüchtet
Atmung: $Q_{O_2} = -17$	Atmung: $Q_{O_2} = -160$
Gärung: $Q_G^{N_2} = +170$	Gärung: $Q_G^{N_2} = -90$
Eisen: $0{,}9 \cdot 10^{-1}$ mg/g Trockensubstanz	Eisen: $1 \cdot 10^{-1}$ mg/g Trockensubstanz
Kupfer: $0{,}4 \cdot 10^{-1}$ mg/g Trockensubstanz	Kupfer: $0{,}7 \cdot 10^{-1}$ mg/g Trockensubstanz
Mangan: —	Mangan: —

Beide Hefen enthielten also reichlich Eisen und Kupfer, und zwar ungefähr gleich viel Eisen, obwohl die Atmung der Rasse U zehnmal so klein war wie die Atmung der Torula. Durch Extrapolation können

[1] WARBURG, O.: diese Zeitschr. 165, 196. 1925. — NEGELEIN, E.: ebendaselbst 165, 203. 1925.

wir aus diesen Zahlen schließen, daß der Eisengehalt der Rasse U bei der Atmung Null nicht wesentlich kleiner sein würde.

Auch die gärenden Extrakte von Hefezellen enthalten reichlich Schwermetall. Ich züchtete Rasse U bei 6° in Bierwürze, die in Glasgefäßen hergestellt und deren Metallgehalt gemessen war. Nach v. LEBEDEW[1] extrahiert, ergab der nicht veraschte Saft pro Kubikzentimeter

$$4 \cdot 10^{-3}\ \text{mg Kupfer},$$
$$3 \cdot 10^{-3}\ \text{mg Eisen},$$

ein Metallgehalt, der beim Umrechnen auf Trockensubstanz zehnmal so groß wird, da der Saft rund 90% Wasser enthält.

Experimentelles.

Die im Laboratorium in Glasgefäßen hergestellte Bierwürze wurde im Platintiegel verascht, der Metallgehalt der Aschenlösung nach der Cysteinmethode[2] bestimmt. Er war pro Kubikzentimeter Bierwürze $0,4 \cdot 10^{-3}$ mg Cu und $0,5 \cdot 10^{-3}$ mg Fe. In 86 ccm Bierwürze wurde eine Öse der Rasse U oder der Torula geimpft und bei 30° 36 Stunden lang Sauerstoff (Torula) oder geglühter Stickstoff (Rasse U) durchgeleitet. Die Ernte betrug 0,6 ccm Zellen. Aus diesen Zahlen und dem Metallgehalt der Würze und der Zellen kann man berechnen, daß zur Zeit der Ernte 1 Volumen Zellen rund 50mal soviel Eisen enthielt als 1 Volumen der sie umspülenden Würze. Der Stoffwechsel der Zellen wurde in Bierwürze gemessen, in der der Sättigungsgrad $\varepsilon = 1$ ist. 0,5 ccm Zellen wurden im Platintiegel ohne Phosphatzusatz verascht (24 Stunden, Heraeus Ofen, ganz schwache Rotglut). Dann wurde mit 0,3 ccm n-Salzsäure aufgenommen, mit Wasser auf 2,2 ccm aufgefüllt, 1½ Stunden im Quarzröhrchen auf 100° erhitzt und in je 0,1 ccm Aschenlösung der Pyrophosphat- und der Borataüsschlag mit Cystein gemessen. — Der Lebedewsaft wurde unverascht und ohne ihn zu konzentrieren nach der Cysteinmethode gemessen. 0,1 ccm gaben sehr beträchtliche Ausschläge. Die oben angegebenen Zahlen sind Minimalzahlen, da möglicherweise ein Teil des Metalls zu fest gebunden ist, um ohne Veraschung von der Cysteinmethode erfaßt zu werden.

15. Kohlenoxyd und Gärung.

Untersucht man die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung, so ist zu beachten, daß Kohlenoxyd die Vermehrung mancher Zellen, z. B. von Hefe, hemmt. Bringt man Hefe in Bierwürze und mißt die Gärung, so steigt sie in Kohlenoxyd langsamer an als in Stickstoff. Auf gleiche Zellenzahlen bezogen, ist jedoch die Gärung in beiden Gasen gleich.

Allgemein hat sich gezeigt, daß Kohlenoxyd die Gärung nicht hemmt, weder die Milchsäuregärung noch die alkoholische Gärung. Selbst in

[1] LEBEDEW, A. v.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 447. 1911.
[2] WARBURG, O.: diese Zeitschr. 187, 255. 1927.

Kohlenoxyd von 60 Atmospharen Druck fand ich keine Wirkung des Kohlenoxyds auf die Garung.

Experimentelles zu den Überdruckversuchen.

Abb. 3 erläutert die Versuchsanordnung.

40 ccm Hefesuspension wurden in die Bombe eingefullt Nach zweimaligem Spulen mit Stickstoff und Kohlenoxyd (10 Atmosphären) und Einpressen von 60 Atmospharen Kohlenoxyd wurde 2—3 Szunden auf der Maschine geschuttelt Dann wurde die Hefesuspension zentrifugiert und der Glucosegehalt in der uberstehenden Flussigkeit polarimetrisch bestimmt. Bei einem Parallelversuch enthielt die Bombe statt 60 Atmosphären Kohlenoxyd 60 Atmosphären Stickstoff, die Hefesuspension 10^{-3} Mole Blausaure pro Liter, zur Hemmung der Atmung (in 60 Atmosphären Bombenstickstoff ist der Sauerstoffdruck etwa 0,3 Atmospharen).

Abb 3

B Stahlbombe von 11 mm Wandstärke und 1,2 Liter Rauminhalt, innen emailliert fur 125 Atm gepruft *E* Einlaßventil mit Manometer *A* Ablaßventil *D* Deckel mit Sechskantenschrauben S auf Unterlage *C* befestigt

Beispiel. Heferasse XII, aerob in Bierwurze gezuchtet. Suspension in m/20 KH_2PO_4 mit 0,5% Glucose. Fur jeden Versuch 40 ccm Hefesuspension mit 300 cmm (= 60 mg) Zellen. Versuchszeit 3 Stunden. Temperatur im Schuttelraum 22°

Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht) vor dem Versuch .	+ 0,61°
Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht) nach 3 Stunden 60 Atm. CO .	+ 0,22°
Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht) nach 3 Stunden 60 Atm N_2 .	+ 0,22°

Die Drehungsabnahmen waren also in Kohlenoxyd und Stickstoff gleich und betrugen 0,39°. Mit $[\alpha]_D = + 52,5°$ berechnet sich daraus ein Zuckerverbrauch von 148 mg fur die Versuchszeit und 60 mg Hefe, oder ein Zuckerverbrauch von 0,82 mg pro Stunde und Milligramm Hefe ($Q_G^{N_2}$ Q_G^{CO} 205)

16. Wirkung des Stickoxyds auf die Gärung.

Wie Kohlenoxyd, so bildet auch Stickoxyd mit einfachen und komplexen Schwermetallsalzen Verbindungen, die bei gewohnlicher Temperatur dissozueren Man kennt reversible Stickoxydverbindungen des Eisens, Kobalts, Nickels, Mangans, Kupfers und anderer Schwermetalle[1], die beim Einleiten von Stickoxyd in die wasserigen Lösungen

[1] Hufner: Zeitschr. f. physikl Chem. 59, 416. 1907 — Kohlschutter und Sazanoff: Ber. 41, 14 23. 1911 — Manchot: ebendaselbst 47, 1601, 1914, 59, 2445. 1926

der Salze entstehen, man kennt auch eine reversible Stickoxydverbindung des Hämoglobins[1], das von HÜFNER entdeckte Stickoxyd-Methämoglobin, in dem das Stickoxyd an Eisen gebunden ist. Bemerkenswert ist der starke Einfluß der Temperatur[2] auf die Dissoziation der Stickoxyd-Metallverbindungen, den man bei der Reinigung des Stickoxyds präparativ benutzt. Man läßt dabei Stickoxyd von Ferrosulfat bei gewöhnlicher Temperatur absorbieren und treibt das Gas durch gelindes Erwärmen wieder aus.

Die Bildung von Stickoxydverbindungen, die bei gewöhnlicher Temperatur dissoziieren, ist nicht weniger spezifisch für Schwermetalle wie die Bildung reversibler Kohlenoxydverbindungen. Ich habe die Wirkung des Stickoxyds auf die Gärung untersucht und gefunden, daß das Gärungsferment eine dissoziierende Stickoxydverbindung bildet. Mit Hinblick auf das Verhalten der einfachen Stickoxyd-Metallverbindungen ist wichtig, daß man Stickoxyd, das bei niedriger Temperatur in Hefe fest gebunden ist, durch Erwärmen auf 37° austreiben kann.

Versuchsanordnung.

Abb. 4 zeigt einen Teil der Versuchsanordnung. Der Kolben K enthält saure Ferrosulfatlösung (50 g $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ + 90 ccm Wasser + 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure), der Trichter T eine Natriumnitritlösung (20 g Natriumnitrit in 50 ccm). S ist ein auf 40° einstehendes Wasserbad, a und b sind Schwanzhähne, 1, 2 und 3 Waschflaschen mit konzentrierter Schwefelsäure, die zur Absorption des Stickstoffdioxyds dienen. Die Gefäße I_a und I_b denke man sich zunächst fort.

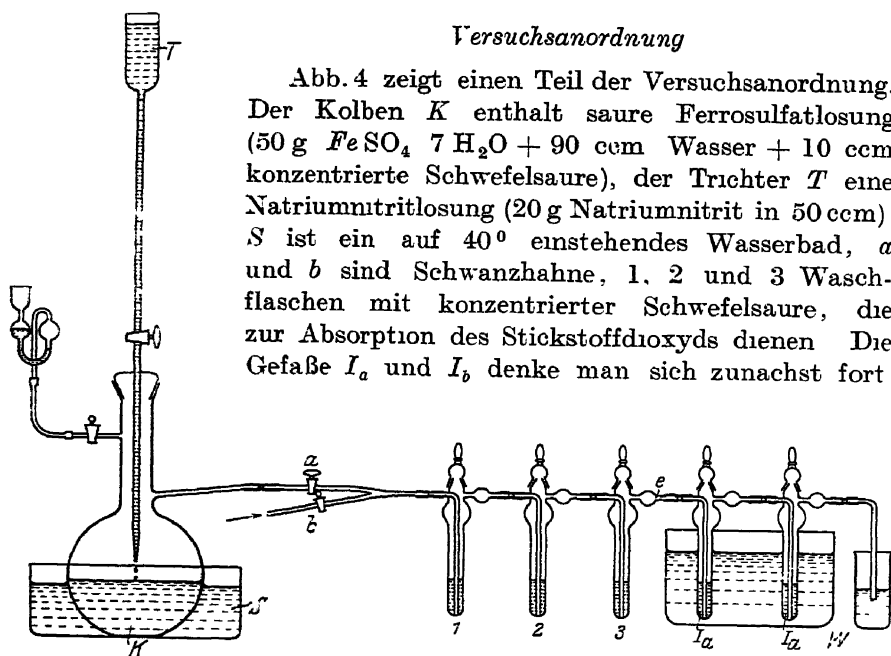



Abb. 4

[1] HÜFNER u. REINHOLD Arch. Anat. Physiol. 1904, Suppl. II, S. 391 — HARTRIDGE Journ. Physiol. 44, 34 — ANSON u. MIRSKY ebendaselbst 60, 100.

[2] THOMAS, V. Cpt. rend. 123, 943, 1896; Bull. Soc. Chim. (3) 19, 419.

Tropft Natriumnitrit in das Ferrosulfat, so entwickelt sich Stickoxyd, das mit dem Luftsauerstoff in KNO_2 bildet und durch den Schwanz des Hahnes *a* nach außen abgeleitet wird. Inzwischen wird das System von *b* aus mit (über Cu) geglühtem Stickstoff durchströmt. Ist die Luft durch den Stickstoff verdrängt, so wird durch Umstellen der Hähne *a* und *b* bewirkt, daß das Stickoxyd durch das System und der Stickstoff nach außen strömt. Bei *e* hat man dann reines Stickoxyd das entweder als solches benutzt oder in einem Quecksilbergasometer mit indifferenten Gasen verdünnt wurde.

Die Gärung in Stickoxyd wurde manometrisch und polarimetrisch gemessen. Zur manometrischen Gärungsmessung wurden die Meßtröge mit Zell- oder Gewebesuspension gefüllt und mit ihren Manometern verbunden. Dann wurden Manometerkapillare und Meßtrog unter Schütteln des Meßtrogs sauerstofffrei gespült und ohne Unterbrechung des Gasstroms mit der NO-haltigen Gasmischung gefüllt. War die Gärung in NO gemessen, so wurden die Meßtröge unter dem Überdruck eines indifferenten Gases geöffnet, mit dem Gas einige Zeit durchströmt und zur Prüfung auf Reversibilität wieder geschlossen.

Zur polarimetrischen Gärungsmessung wurden bei *e* (Abb. 4) zwei Flaschen, I_a und I_b, mit Hefesuspension angesetzt, in einem durch Eisstücke auf 0° gehaltenen Wasserbad (*W*). Sie wurden von *e* aus sauerstofffrei gespült, dann mit Stickoxyd gesättigt, auf 20° erwärmt und 1 Stunde lang in Stickoxyd bei 20° gehalten. Dann wurde wieder auf 0° gekühlt, mit Stickstoff gewaschen, zentrifugiert und in der überstehenden Flüssigkeit der Zuckerverbrauch polarimetrisch bestimmt. Mit I_a und I_b stand eine Kontrollsuspension in dem Wasserbad *W*, die während der gesamten Versuchszeit mit Stickstoff durchströmt wurde. Sie machte alle Temperaturänderungen, denen I_a und I_b unterworfen waren, mit, und ergab die Normalgärung während der Versuchszeit.

Die Komplikation bei den Stickoxydversuchen ist, daß NO sich mit Luftsauerstoff und Wasser zu salpetriger und Salpetersäure umsetzt. Deshalb muß vor dem Einleiten des Stickoxyds der Sauerstoff aus den Gefäßen und Lösungen ausgetrieben sein.

Hemmung der Milchsäuregärung.

Als Versuchsobjekt benutzte ich Tumorschnitte. 95 Vol.-% Stickoxyd hemmte die Tumorgärung bei 37° um 50—60%. Wurde das Stickoxyd durch Stickstoff ersetzt, so stieg die Tumorgärung wieder auf ihren Normalwert.

Jensen-Sarkom in Ringerlösung bei 37,5°. 2,5 10^{-2} n $NaHCO_3$. 0,2% Glucose.

Versuch 1	Versuch 2
mm Druckänderung	mm Druckänderung
5% CO_2, 95% N_2: 10′: + 18	5% CO_2, 95% N_2. 10′: + 12
10′: + 17.5	5% CO_2, 95% NO· 10′: + 6
5% CO_2, 95% NO: 10′· + 7	5% CO_2, 95% N_2: 10′: + 10,5
5% CO_2, 95% N_2: 10′. + 16,5	10′: + 11,5

Hemmung der alkoholischen Gärung.

Bei den Versuchen mit Hefe spielt die Temperatur eine wichtige Rolle. Je höher die Temperatur während der Stickoxydbehandlung ist, um so schlechter sind die Hemmungen reversibel. Hefe, deren Gärung bei 37° durch Stickoxyd gehemmt worden ist, gärt nach Entfernung des Stickoxyds nicht mehr, weder bei 37°, noch bei einer anderen Temperatur. Andererseits kann man das an Gärungsferment gebundene Stickoxyd um so leichter austreiben, je höher die Temperatur ist. Es sind also zwei verschiedene Reaktionen des Stickoxyds zu unterscheiden, eine reversible mit dem Gärungsferment und eine irreversible Nebenreaktion, die die Zellen tötet, um so schneller, je höher die Temperatur ist. Diese Nebenreaktion hat man nicht in Tumorzellen, die deshalb ein geeigneteres Objekt für NO-Versuche sind als Hefe.

1. Beispiel. Bäckerhefe manometrisch. Suspensionsflüssigkeit m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose.

Gefäß I 12 cmm Hefe in 2 ccm	Gefäß II 12 cmm Hefe in ccm
10,7°	10,7°
100% H_2	80% H_2, 20% NO
5′: 9,9 cmm CO_2	5′· 2,4 cmm CO_2
5 : 10,3 cmm CO_2	5 1,6 cmm CO_2
↓	↓
10,7°	10,7°
100% H_2	100% H_2
5′: 11,4 cmm CO_2	5′ 3,2 cmm CO_2
5 : 10,3 cmm CO_2	5 : 3,2 cmm CO_2
↓	↓
37,5°	37,5°
100% H_2	100% H_2
1te 5′: 91 cmm CO_2	1te 5′: 45 cmm CO_2
2te 5 : 95 cmm CO_2	2te 5 : 52 cmm CO_2
8te 5 : 85 cmm CO_2	8te 5 : 85 cmm CO_2
9te 5 : 88 cmm CO_2	9te 5 : 89 cmm CO_2

20% NO hemmte also die Gärung bei 11° um 85%. Wurde das NO bei 11° durch H_2 ersetzt, so betrug die Gärungshemmung 70%. Diese Hemmung verschwand bei 37,5°.

2. Beispiel. Bäckerhefe polarimetrisch. Suspension in m/2 KH_2PO_4, 0,48% Glucose. Die Suspension enthielt pro Kubikzentimeter 10 cmm (= 2 mg) Zellen. Vier Gefäße wie *I*, Abb. 4, mit 15 ccm Zellsuspension, I_a und I_b mit 100% NO, II_a und II_b mit N_2 durchströmt. Durchströmungszeiten: I_a und I_b: 70 Minuten mit N_2 bei 0°, 5 Minuten mit NO bei 0°, 60 Minuten mit NO bei 20°, 10 Minuten mit NO bei 0°, 90 Minuten mit N_2 bei 0°. II_a und II_b: wie I_a und I_b, aber immer mit N_2.

Drehung im 2-dcm-Rohr (Na-Licht) vor dem Versuch: + 0,51°, Flüssigkeit aus I_a und I_b: + 0,50°, Flüssigkeit aus II_a und II_b: + 0,25°.

In Stickstoff war also pro Kubikzentimeter Suspension 2,35 mg Glucose vergoren. In Stickoxyd war die Gärung fast Null.

Ein Teil der Suspensionen aus *I* und *II* wurde zur Prüfung auf Reversibilität benutzt. Manometrisch:

1 ccm Suspension aus Gefäß II direkt bei 20°	1 ccm Suspension aus Gefäß I direkt bei 20°	1 ccm Suspension aus Gefäß I bei 20°, nachdem vorher 1 Stunde bei 37,5° in N_2 geschüttelt worden war
in N_2	in N_2	in N_2
10′: 68 cmm CO_2	10′: 34 cmm CO_2	10′: 58 cmm CO_2
10 : 69 cmm CO_2	10 : 36 cmm CO_2	10 : 56 cmm CO_2

Die vorher vollständige Gärungshemmung betrug also 49%, wenn bei 0° mit N_2 durchströmt war, und 17%, wenn bei 37,5° mit N_2 geschüttelt war.

Klin. Wochenschr. 1927, 6. Jahrg., Nr 23

Über Kupfer im Blutserum des Menschen.

Von
Otto Warburg.

Bei Versuchen, Eisen im Blutserum zu bestimmen, zeigte sich, daß das Serum des Menschen konstant Kupfer in lockerer Bindung und in relativ großen Mengen enthalt

Die Methode der Kupferbestimmung im Serum beruht auf der oxydationskatalytischen Wirkung des Kupfers. In die zu prufende Flussigkeit, deren p_H durch Puffer festgelegt ist, bringt man reines Cystein, schüttelt mit Luft und beobachtet manometrisch, ob und wie schnell Sauerstoff absorbiert wird Ist die Flussigkeit frei von Schwermetall, so oxydiert sich das Cystein nicht Enthalt die Flüssigkeit Eisen, Kupfer oder Mangan, so wird Sauerstoff verbraucht, und aus der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs wird die Metallmenge berechnet Es ist leicht, auf diese Weise einige $^1/_{100000}$ Milligramme Metall nachzuweisen und zu bestimmen

Durch Zusatze laßt sich entscheiden, welches der drei genannten Metalle vorliegt Mangan wird durch sein besonderes Verhalten gegen Blausaure erkannt. Kupfer zeichnet sich vor Eisen und Mangan dadurch aus, daß seine Wirkung durch Natriumpyrophosphat nicht gehemmt wird

0,1 ccm Serum ,zu 2 ccm einer Cysteinlosung hinzugefugt, bewirkt bei geeignetem p_H und bei 20° eine gut meßbare Oxydation Verascht man das Serum, bringt die Aschenlosung auf das Volumen des Serums und wiederholt mit 0,1 ccm Aschenlosung den Oxydationsversuch, so berechnet sich aus der Oxydation in Pyrophosphat die gleiche Kupfermenge im veraschten und nichtveraschten Serum. Sie betragt beim gesunden erwachsenen Menschen 1×10^{-3} bis 2×10^{-3} mg Kupfer in 1 ccm Serum. Dieses Kupfer ist also so locker gebunden, daß es sich mittels der Cysteinmethode ohne vorherige Veraschung des Serums bestimmen laßt

Um sich von dem Kupfergehalt des Serums eine Vorstellung zu bilden, kann man ihn mit dem Eisengehalt des Gesamtbluts, d. h mit dem Hamoglobineisen vergleichen Es zeigt sich dann, daß die Kupfermenge 0,2 bis 0,4% der Gesamteisenmenge betragt —

Ich habe das Ergebnis der Cysteinmethode durch eine ältere chemische Methode kontrolliert, die colorimetrische Bestimmung des Kupfers mit Kaliumferrocyanid. 5 ccm Serum wurden nach Zusatz von 1 ccm KH_2PO_4 zur Trockne verdampft, 6 Stunden im elektrischen Ofen bei ganz schwacher Rotglut erhitzt, bis die Asche weiß war, dann mit 1 ccm n-HCl in der Kälte aufgenommen, von einer Spur Kohle abzentrifugiert und mit 0,1 ccm frischer Kaliumferrocyanidlösung versetzt. Es trat die rotbraune Färbung des Kupferferrocyanids auf, und zwar rein, nicht in Mischfarbe mit Berlinerblau. Denn beim Glühen mit Phosphat bildete sich Pyrophosphat, das die Reaktion des Eisens, nicht aber die Reaktion des Kupfers mit Ferrocyanid verhindert. Ist neben dem Kupfer in der Asche viel Eisen, so verblaßt die rotbraune Färbung allmählich. Ich finde colorimetrisch mit Ferrocyanid ebensoviel Kupfer im Serum, wie mit der Cysteinmethode. —

Zum Schluß erwähne ich, daß in der Asche von Säugetierorganen vielfach Kupfer gefunden worden ist, so von K. B. LEHMANN[1], ROST und WEITZEL[2] u. a., daß es ferner DESGREZ und MEUNIER[3] gelang, in der Asche von 1 kg Pferdeserum Kupfer nachzuweisen. (*Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.*)

Literatur: [1] Arch f. Hyg. **24**, 18. 1895. — [2] Arb. a. d. Reichsgesundheitsamte **51**, 494. 1919. — [3] Chem. Zentralbl. 1920, IV, S. 426.

II. Kohlensäureassimilation und Nitratassimilation.

Biochem. Zeitschr 166, 386. 1925.

Versuche über die Assimilation der Kohlensäure[1].

Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 5. Oktober 1925.)

Mit 5 Abbildungen.

Versuchsobjekt.

Unser Versuchsobjekt ist Chlorella, eine im Durchmesser 3 bis 6 μ messende Grünalge, die sich leicht im Laboratorium in großen Mengen züchten[2] läßt. Die Kulturflüssigkeit ist eine Lösung von Natriumnitrat, Magnesiumsulfat und saurem Kaliumphosphat, durch die kohlensäurehaltige Luft geleitet wird. Die Geschwindigkeit des Wachstums sowie der Chlorophyllgehalt der entstehenden Zellen hängt von der Intensität der Belichtung ab. Belichtet man schwach, so entstehen bei langsamem Wachstum Zellen, die bis 5% Chlorophyll[3] enthalten. Belichtet man stark, so entstehen bei schnellem Wachstum Zellen mit einem Chlorophyllgehalt von etwa 2%.

Neben dem Chlorophyll enthält das Assimilationsorgan der Alge die gelben Begleitpigmente des Chlorophylls, Caroten und Xantophyll, die nach WILLSTÄTTERS Methode[4] von dem Chlorophyll getrennt werden können. Die gelben Begleitpigmente absorbieren Licht nur im Blaugrün und Blau, während Chlorophyll in dem ganzen Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums absorbiert. Der Bruchteil der Gesamtabsorption, der bei der Wellenlänge 436 μμ auf die gelben Pigmente entfällt, beträgt[5] — in dem methylalkoholischen Chlorellaextrakt — etwa 30%.

Durch Schütteln eines Algensediments mit wässerigen Flüssigkeiten werden Suspensionen gewonnen, die sich mit Pipetten wie Flüssigkeiten

---

[1] Ein Auszug dieser Zusammenfassung ist in den Naturwissenschaften, Heft 49. 1925, erschienen.

[2] Zeitschr. f. physikal. Chem. 102, 250. 1922.

[3] Ebendaselbst 102, 266. 1922.

[4] WILLSTÄTTER u. STOLL, Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913.

[5] Zeitschr. f. physikal. Chem. 106, 197. 1923.

der Maßanalyse abmessen lassen Die Alge ist widerstandsfähig gegen mechanische und chemische Einwirkungen Sie kann ohne Schadigung auf der Zentrifuge aus ihrer Nahrlosung abgeschleudert und in andere Lösungen ubertragen werden Sie assimiliert Kohlensaure in Losungen der verschiedensten Zusammensetzung, in stark sauren und alkalischen Flussigkeiten und in reinem Wasser[1]. Sie verbraucht bei 20° und im Dunkeln pro Stunde ein ihrem Volumen gleiches Volumen an Sauerstoff und zersetzt bei intensiver Bestrahlung pro Stunde etwa das 20fache ihres Volumens an Kohlensaure.

Meßmethoden.

Wir messen die Assimilation gasanalytisch[2] oder manometrisch[3]. Zur gasanalytischen Messung schließen wir eine Algensuspension mit kohlensäurehaltiger Luft in einen Rezipienten ein und bestimmen Kohlensäure- und Sauerstoffgehalt vor und nach der Bestrahlung. Durch einen gleichzeitig angestellten Dunkelversuch wird die Atmung ermittelt, die bei der Berechnung der Assimilation zu dem Gaswechsel des Hellversuchs zu addieren ist

Bequemer und genauer als das gasanalytische ist das manometrische Verfahren. Diese Methode ist im Falle der Kohlensäureassimilation nicht ohne weiteres anwendbar, weil ungefahr ebensoviel Sauerstoff entsteht, als Kohlensaure verschwindet, eine nennenswerte Druckanderung im allgemeinen also nicht auftritt. Vergroßert man aber das Flussigkeitsvolumen gegenuber dem Gasraum, so entstehen — wegen der verschiedenen Loslichkeit des Sauerstoffs und der Kohlensaure — betrachtliche positive Drucke, aus denen die Kohlensaurezersetzung berechnet werden kann Wir lesen die Manometerausschlage in kurzen Zeitintervallen — etwa von 10 zu 10 Minuten — ab und haben so den gesamten Verlauf der Assimilation vor Augen, ein Vorteil gegenuber dem gasanalytischen Verfahren, das nur den Anfangs- und Endzustand liefert

Als Manometer benutzen wir sogenannte Blutgasmanometer nach Barcroft und Haldane[4] oder Differentialmanometer nach Barcroft[5] Das Barcroftsche Differentialmanometer ist einem von E Warburg zur Messung der Desozonisation verwendeten Differentialmanometer[6] sehr ahnlich und unterscheidet sich von ihm im wesentlichen durch zwei Hahne, durch die zu jeder Zeit die Verbindung mit der außeren Atmosphare hergestellt werden kann

---

[1] Diese Zeitschr. **100**, 231. 1919.
[2] Zeitschr f. physikal Chem. **102**, 252. 1922; diese Zeitschr. **110**, 69 1920
[3] Diese Zeitschr. **100**, 235 1919; **110**, 71. 1920.
[4] Journ. of Physiol. 28, 232. 1902.
[5] Ebendaselbst **37**, 12. 1908.
[6] Ann. d. Phys., 4. Folge, **9**, 781. 1902.

Die Assimilationskurve.

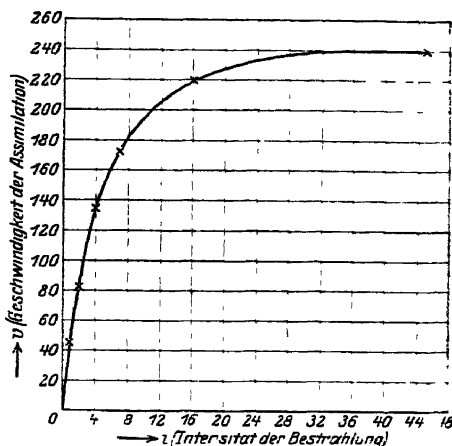
Bestrahlt man grüne Zellen bei konstanter Temperatur und Überschuß von Kohlensäure mit verschiedenen Intensitäten i und mißt die Assimilationsgeschwindigkeiten v, so erhält man Kurven von der Form der Abb 1, in der i und v in willkürlichen Einheiten eingetragen sind[1] $\frac{dv}{di}$ ist bei kleinen Intensitäten konstant, nimmt mit wachsender Intensität ab und wird schließlich Null

Abb 1

Blackman[2] machte die wichtige Entdeckung, daß die Assimilationsgeschwindigkeit bei niedrigen Intensitäten — in dem Gebiet des geraden Anfangsteils der Kurve — von der Temperatur unabhängig ist daß aber die Assimilationsgeschwindigkeit bei intensiver Bestrahlung mit der Temperatur stark ansteigt Es bestimmen also je nach der Intensität der Bestrahlung, verschiedene Vorgänge die Geschwindigkeit der Assimilation Wir unterscheiden beide Vorgänge als die „photochemische Reaktion" und die „Blackmansche Reaktion" und definieren sie, indem wir die Versuchstemperatur mit ϑ bezeichnen durch die Bedingungen

$$\text{Photochemische Reaktion} \quad \frac{dv}{di} \text{ konstant} \quad \frac{dv}{d\vartheta} = 0,$$

$$\text{Blackmansche Reaktion} \quad \frac{dv}{di} = 0, \quad \frac{dv}{d\vartheta} \quad 0$$

Die Blackmansche Reaktion die durch Bestrahlung nicht beeinflußt wird ist eine gewöhnliche chemische Reaktion Sie geht der photochemischen Reaktion voran oder folgt auf sie Die photochemische Reaktion ist der Vorgang, in dem absorbierte Strahlungsenergie in chemische Energie verwandelt wird Sie ist in Übereinstimmung mit den Erfahrungen der allgemeinen Photochemie von der Temperatur unabhängig und proportional der absorbierten Strahlung

[1] Diese Zeitschr. 100, 255 1919 Ähnliche Kurven für andere Objekte findet man bei Willstätter und Stoll · Assimilation der Kohlensäure, S 149 Berlin 1918

[2] Ann of Bot. 19, 281 1905.

Wir untersuchen die Assimilation entweder bei sehr schwacher oder bei sehr starker Bestrahlung und vernachlassigen das Zwischengebiet der Intensität, das allerdings das praktisch wichtige ist. Wir trennen so die Einflusse, die die photochemische Reaktion und die BLACKMANsche Reaktion ausuben Auch in dieser Darstellung werden wir die Trennung in photochemische Reaktion und BLACKMANsche Reaktion, soweit dies moglich ist, durchfuhren

Die photochemische Reaktion.

Charakteristisch fur eine photochemische Reaktion ist[1] „die chemische Wirkung, die von der Einheit der absorbierten Strahlungsenergie hervorgebracht wird In seinen grundlegenden photochemischen Arbeiten nennt E WARBURG dieses Verhaltnis die spezifische photochemische Wirkung und bezeichnet es mit φ.

Bei der Kohlensaureassimilation wird die photochemisch wirksame Strahlung nicht von derjenigen Substanz absorbiert, die gespalten wird. Die Substanz, die gespalten wird, ist die Kohlensaure, die Substanzen, die die wirksame Strahlung absorbieren, sind — in grunen Zellen — Chlorophyll, Xantophyll und Caroten. φ bei der Kohlensaureassimilation ist also die zersetzte Kohlensaure, dividiert durch die von den Pigmenten des Chlorophyllkorns absorbierte Strahlungsenergie

Bei der Kohlensaureassimilation ist die spezifische photochemische Wirkung — für eine bestimmte Wellenlange — nicht konstant, sondern andert sich mit der Intensitat der Bestrahlung Wie aus der Form der Assimilationskurve hervorgeht, nimmt φ mit der Intensitat der Bestrahlung ab und ist am großten bei kleinen Intensitaten, bei denen die photochemische Wirkung proportional der Intensitat ist Nur dieser besondere Wert von φ, den wir φ_0 nennen, ist fur die photochemische Reaktion bei der Kohlensaureassimilation charakteristisch

Die Versuche von Brown und Escombe.

Wenn auch in der Literatur keine Versuche vorliegen, aus denen die spezifische photochemische Wirkung bei der Kohlensaureassimilation berechnet werden kann, so gibt es doch Arbeiten, die zu unserer Fragestellung in Beziehung stehen.

BROWN und ESCOMBE[2] bestrahlten grune Blatter mit unzerlegtem Sonnenlicht und bestimmten die Kohlensaurezersetzung pro Kalorie auffallender Strahlung. Indem sie die Verbrennungswarme der ent-

[1] WARBURG, E.: Quantentheoretische Grundlagen der Photochemie, Zeitschr f Elektrochem. 26, 54. 1920

[2] Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, 76, 29. 1905.

standenen Kohlehydrate mit der Energie der auffallenden Sonnenstrahlung verglichen, konnten sie das Verhaltnis

$$\frac{\text{gewonnene chemische Energie}}{\text{Energie der auffallenden Sonnenstrahlung}}$$

berechnen.

Brown und Escombe arbeiteten zum Teil mit ungeschwachtem Sonnenlicht, zum Teil mit geschwachtem Sonnenlicht und gingen bei ihren Versuchen bis auf Intensitaten von $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensitat herunter. Hierbei stieg, wie es nach der Assimilationskurve sein muß, die Ausnutzung des Sonnenlichtes Bei $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität fanden sie, daß 4,1% der auffallenden Sonnenenergie in chemische Energie verwandelt wurde.

Bei den Versuchen von Brown und Escombe wurde ein Teil der auf das Blatt fallenden Sonnenstrahlung reflektiert und zerstreut, ein Teil von der farblosen Blattsubstanz (Warmestrahlen) und von den Pigmenten des Chlorophyllkorns absorbiert Der Rest ging durch das Blatt durch und konnte von einem auf der Ruckseite des Blattes aufgestellten Meßinstrument aufgefangen werden Dieser Rest betrug im Durchschnitt 25% der auffallenden Energie Da dieser Rest sicher photochemisch unwirksam war, so schlossen Brown und Escombe, daß mindestens 6% der auffallenden Sonnenenergie in chemische Energie verwandelt werden konnen.

Die Rechnung von F. Weigert.

Aus den Versuchen von Brown und Escombe kann die spezifische photochemische Wirkung nicht berechnet werden, weil die von den Pigmenten des Chlorophyllkorns absorbierte Strahlungsenergie nicht gemessen worden ist Wir erfahren zwar daß die Strahlungsintensitat auf der Hinterseite des Blattes um 75% kleiner ist als auf der Vorderseite des Blattes, aber wir erfahren nicht wieviel von diesem Verlust auf Rechnung der Absorption durch die Blattpigmente zu setzen ist

In Zusammenhang mit der Frage der Absorption steht folgender Versuch, den Brown und Escombe in ihrer Arbeit, ohne weitere Schlusse aus ihm zu ziehen, mitteilten Grune und weiße (sogenannte Albino-) Blatter derselben Pflanze, des Acer negundo wurden mit unzerlegtem Sonnenlicht bestrahlt und die Intensitat des Sonnenlichtes auf der Vorder- und Ruckseite der Blatter gemessen War die Intensitat auf der Vorderseite der Blatter 100, so waren die Intensitaten auf der Hinterseite

des weißen Blattes	25.5
des grunen Blattes .	21.3

Aus diesem Versuch berechnete WEIGERT[1] die von den Pigmenten des grünen Blattes absorbierte Energie zu 25,5—21,3 = 4,2%. Da nun nach BROWN und ESCOMBE bei Bestrahlung mit $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität 4,1% der auffallenden Energie als chemische Energie gewonnen werden, so berechnete WEIGERT die Ausbeute an chemischer Energie bei $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität zu

$$\frac{4,1}{4,2} \cdot 100 = 98 \text{ Proz.}$$

Bei $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität macht sich, worauf BROWN und ESCOMBE ausdrücklich hinweisen, eben ein Einfluß der Intensität auf die photochemische Wirkung bemerkbar. Bei $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität befinden wir uns also an einer Stelle der Assimilationskurve, an der sie beginnt, sich gegen die x-Achse zu neigen (etwa Punkt $i = 16$ der Abb. 1). Geht man auf niedrigere Intensitäten herunter, so steigt die Ausnutzung der Energie — die immer proportional dem Verhältnis $\frac{\text{Ordinate}}{\text{Abszisse}}$ der Assimilationskurve ist —, und zwar, wenn man in Abb. 1 von $i = 16$ auf $i = 1$ heruntergeht, auf das Dreifache. Wäre also der Gewinn an chemischer Energie bei $^1/_{12}$ Sonnenlichtintensität 98%, so wäre er bei niedriger Intensität rund 300%.

Es folgt daraus, daß die Rechnung von WEIGERT auch nicht der Größenordnung nach richtig sein kann. WEIGERT übersah, worauf WILLSTÄTTER[2] aufmerksam machte, daß die Lichtschwächungen durch die weiße Blattsubstanz in dem grünen und dem weißen Blatte nicht gleich sind. Die lichtschwächende Wirkung der weißen Substanz ist in dem grünen Blatte kleiner als in dem weißen Blatte, weil in jedes innerhalb des grünen Blattes liegende Volumenelement weniger Lichtenergie einströmt als in ein entsprechendes Volumenelement des weißen Blattes.

Man kann heute, wo der Energieumsatz bei niedrigen Intensitäten bekannt ist, den Energieumsatz bei den von BROWN und ESCOMBE angewandten Intensitäten schätzen und als Höchstgrenze 20% angeben; das ist ein Fünftel des von WEIGERT berechneten Wertes. Die von den Pigmenten des grünen Blattes absorbierte Energie war mindestens fünfmal so groß, wie WEIGERT annahm.

Trotzdem bleibt WEIGERT dabei[3], daß durch den Versuch mit dem weißen und grünen Blatte, aus dem er den Energieumsatz berechnete, die von den Blattpigmenten absorbierte Energie „gemessen" worden sei, wenn auch „ungenau", und gründet auf diese, nur dem Wortlaut nach zutreffende Behauptung einen Prioritätsanspruch.

[1] Zeitschr. f. wiss. Photogr. **11**, 381. 1912.

[2] Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, S. 120. Berlin 1918.

[3] Zeitschr. f. physikal. Chem. **106**, 313. 1923.

Ältere Versuche über die Wirkung der Spektralbezirke.

Während BROWN und ESCOMBE mit unzerlegtem Sonnenlicht arbeiteten, haben andere Autoren die Wirkung der verschiedenen Spektralbezirke untersucht, so DRAPER[1], PFEFFER[2], ENGELMANN[3], TIMIRIAZEFF[4], KNIEP und MINDER[5] und viele andere.

DRAPER zerlegte Sonnenlicht mittels eines Prismas, ließ die Spektralbezirke getrennt auf grüne, in kohlensäurehaltigem Wasser befindliche Blätter einwirken und bestimmte den bei der Kohlensäurezersetzung entwickelten Sauerstoff. DRAPER fand die folgenden relativen Sauerstoffmengen, bezogen auf gleiche Blattmengen und Versuchszeiten:

	Sauerstoffentwicklung
Im intensiven Rot und Rot .	—
„ Rot und Orange . .	25
„ Gelb und Grün	44
„ Grün und Blau	4
„ Blau	1
„ Indigo	0
„ Violett	0

PFEFFER wiederholte die Versuche von DRAPER mit dem Unterschied, daß er an Stelle des Prismas Farbfilter verwandte und an Stelle des entwickelten Sauerstoffs die zersetzte Kohlensäure bestimmte. Er fand die folgenden relativen Kohlensäurezersetzungen, bezogen auf gleiche Blattmengen und Versuchszeiten:

	Kohlensäurezersetzung
Im Rot und Orange	32
„ Gelb	46
„ Grün	15
„ Blau, Indigo und Violett	7.6

Mit einer anderen Methode arbeitete ENGELMANN. ENGELMANN beobachtete, daß sich gewisse Fäulnisbakterien an Stellen höherer Sauerstoffkonzentration ansammeln. Brachte er solche Bakterien mit einem Algenfaden in einen hängenden Tropfen und projizierte auf den Algenfaden ein Spektrum, so häuften sich die Bakterien in den verschiedenen Farben nach Maßgabe der Sauerstoffausscheidung an. Die Höhen der Bakterienhaufen betrachtete ENGELMANN als Maß der photochemischen Wirkungen und fand so im Normalspektrum der Sonne die folgenden relativen Wirkungen:

---

[1] DRAPER, J. W.: Ann. de Chim. et de Phys. (3) 11, 214. 1844.

[2] PFEFFER, W.: Arbeiten des Botanischen Instituts in Würzburg 1, 1. Leipzig 1874.

[3] ENGELMANN, TH. W.: Bot.-Ztg. 39, 441. 1881; 40, 419. 1882; 41, 1. 1883.

[4] TIMIRIAZEFF, C.: Proc. of the roy. soc. of London 72, 424. 1904 (Croonian Lecture).

[5] Zeitschr. f. Bot. 1, 619. 1909.

Fraunhofersche Linien								
a	*B*½*C*	*C*½*D*	*D*	*D*½*E*	*E*½*b*	*E*½*F*	*F*	*G*
Relative Wirkung								
6	100	81	55	44	36	70	86	47

Neben den relativen photochemischen Wirkungen bestimmte Engelmann die Bruchteile γ der auffallenden Strahlung, die von seinem Versuchsobjekt in den verschiedenen Farben absorbiert wurden. Trug er diese Bruchteile neben den photochemischen Wirkungen als Funktion der Wellenlänge auf, so erhielt er zwei Kurven von ähnlichem Verlauf, woraus er schloß, daß „Assimilation und Absorption zusammengehen".

Wenn dieser Schluß mehr besagen soll, als daß nur absorbierte Strahlung wirkt, so ist er unrichtig. Die von Engelmann gemessenen γ-Werte standen nicht im Verhältnis der absorbierten Energiemengen, weil die auffallenden Intensitäten in den verschiedenen Spektralbezirken ungleich waren.

Im ganzen folgte aus den früheren Arbeiten über Assimiliation in verschiedenfarbigem Lichte — von denen hier nur die wichtigsten erwähnt sind —, daß in jedem Bezirk des sichtbaren Spektrums Kohlensäure assimiliert wird, aber nicht mehr. Insbesondere blieb die spezifische photochemische Wirkung sowohl absolut als auch relativ unbestimmt, weil die absorbierte Energie weder absolut noch relativ gemessen worden war.

Messung der spezifischen photochemischen Wirkung[1].

Wir umgehen die Schwierigkeiten der Absorptionsmessung, indem wir mit vollständiger Absorption arbeiten, d. h. wir füllen in unsere Versuchströge so dichte Suspensionen von Chlorella ein, daß die gesamte in die Tröge eingestrahlte Energie absorbiert wird. Dann ist die absorbierte Energie gleich der eingestrahlten Energie.

Wir messen die eingestrahlte Energie bolometrisch nach einer von E. Warburg und seinen Mitarbeitern angegebenen Methode[2], die wir in dem Laboratorium der Herren E. Warburg und C. Müller gelernt haben. Die Intensität der eingestrahlten Energie ist im Mittel $3 \cdot 10^{-5}$ cal/qcm × Sek., die bestrahlte Fläche mißt 17 qcm, die Versuchszeit beträgt 10 Minuten. Es werden also im Mittel $600 \cdot 17 \cdot 3 \cdot 10^{-5} = 0{,}3$ cal während eines Versuchs in den Assimilationstrog eingestrahlt.

Wir messen die photochemische Wirkung manometrisch. Als Sperrflüssigkeit benutzen wir Capronsäure, weil sie leicht beweglich ist und trotzdem — bei Zimmertemperatur — nur einen kleinen Dampfdruck

---

[1] Zeitschr. f. physikal. Chem. **102**, 235. 1922; **106**, 191. 1923 (mit E. Negelein).
[2] Warburg, E., G. Leithäuser, E. Hupka u. C. Müller, Ann. d. Phys. (4), **40**, 609. 1913.

besitzt. Die Manometerausschläge betragen, wenn 0,3 cal eingestrahlt sind, 10 bis 20 mm Capronsäure und werden mit einem Kathetometermikroskop auf 5% genau abgelesen. Erheblich genauer ist die bolometrische Strahlungsmessung, so daß die spezifische photochemische Wirkung im allgemeinen auf 5% genau erhalten wird.

Bei jeder Messung prüfen wir, ob die Intensität hinreichend klein ist, indem wir die Intensität der eingestrahlten Energie variieren. Die in den gleichen Zeiten beobachteten Manometerausschläge, dividiert durch die Intensitäten, müssen dann gleich sein.

Als Strahlungsquelle benutzen wir für die Rotversuche eine Metallfadenlampe, aus deren Strahlung wir durch prismatische Zerlegung einen von 610 bis 690 $\mu\mu$ reichenden Spektralbezirk gewinnen. Für die Versuche im Gelb, Grün und Blau isolieren wir aus der Strahlung der Quecksilberdampflampe die Linien 578, 546 und 436 $\mu\mu$ mit Hilfe von Strahlenfiltern.

Ergebnis der Messungen.

In Tabelle I ist das Ergebnis der Messungen zusammengestellt. Spalte 2 enthält die φ_0-Werte in cmm CO_2/cal, Spalte 3 in Molen CO_2/cal, Spalte 4 in cal/cal · 100. Bei der Umrechnung von Molen in Kalorien ist angenommen, daß die Energiegleichung der Kohlensäureassimilation ist

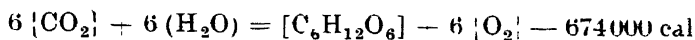
$$6\,\{CO_2\} + 6\,(H_2O) = [C_6H_{12}O_6] + 6\,\{O_2\} - 674\,000 \text{ cal}$$

Die φ_0-Werte der Tabelle sind Mittelwerte, und zwar im Rot aus 18, im Gelb aus 36 und im Blau aus 20 φ_0-Messungen. Im Grün haben wir nur zwei mehr orientierende Messungen ausgeführt, weil die Versuche im Grün weniger genau sind (Fehlergrenze etwa 10%). Aus diesem Grunde sind die Grünwerte in der Tabelle eingeklammert.

Tabelle 1.

1	2	3	4	5
Spektralbezirk	φ_0 cmm CO_2/cal	φ_0 Mole CO_2/cal	φ_0 $\frac{\text{cal}}{\text{cal}} \cdot 100$	Absorptionskoeffizient α einer methylalkoholischen Lösung d. Chlorella-Pigmente
Rot 610 bis 690 $\mu\mu$ Schwerpunkt 660 $\mu\mu$	117	$5{,}3 \cdot 10^{-6}$	59	1,04
Gelb 578 $\mu\mu$	106	$4{,}8 \cdot 10^{-6}$	54	0,207
Grün 546 $\mu\mu$	(88)	$(4{,}0 \cdot 10^{-6})$	(44)	0,115
Blau 436 $\mu\mu$	67	$3{,}0 \cdot 10^{-6}$	34	2,67

Aus der Tabelle erkennt man

1. daß die spezifische photochemische Wirkung in den vier untersuchten Spektralgebieten bemerkenswert groß ist; druckt man die Wirkung in Kalorien aus, so werden im Rot fast 60% der absorbierten Strahlungsenergie als chemische Energie gewonnen;

2. daß die spezifische photochemische Wirkung im Spektrum von Rot nach Blau hin abnimmt. Die Wirkung im Blau ist etwas mehr als halb so groß wie die Wirkung im Rot, dazwischen liegen die Werte für Gelb und Grün. Eine Beziehung der spezifischen photochemischen Wirkung zu der Stärke der Absorption besteht nicht. Der Absorptionskoeffizient einer Lösung der Chlorellapigmente ist im Blau am größten, wo die Wirkung am kleinsten ist. (Vgl. Spalte 5 der Tabelle und Abb. 2, in der die Absorptionskoeffizienten α einer methylalkoholischen Pigmentlösung als Funktion der Wellenlänge dargestellt sind. α ist $\frac{-di/dx}{i}$, $-di$ die Abnahme der Lichtintensität i auf dem Wege dx.)

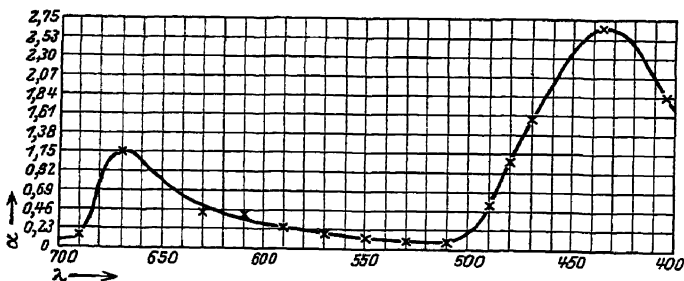



Abb. 2

Die spezifische photochemische Wirkung nach R. Wurmser.

Kürzlich hat R. WURMSER[1] versucht, die spezifische photochemische Wirkung bei der Kohlensäureassimilation zu messen und als Versuchsobjekt Ulva lactuca benutzt. Die Spektralbezirke waren Rot und Grün. Für φ_0 im Rot gibt WURMSER 60%, für φ_0 im Grün 80% an.

Ähnlich wie WEIGERT berechnete WURMSER die Lichtabsorption aus den Lichtschwächungen, die grüne und weiße (entfärbte) Ulvastücke hervorbrachten. Da dieses Verfahren, wie oben erörtert, nicht einmal der Größenordnung nach richtige Werte liefert, so können wir die WURMSERschen Zahlen nicht gelten lassen und halten auch seine Bestätigung unserer Rotversuche für ein zufälliges Rechenergebnis.

WURMSER selbst betrachtet seine Messungen nicht als endgültig. Im besonderen legt er auf den von ihm gefundenen Unterschied zwischen

[1] Ann. d. Physiol. 1, 47. 1925.

der Ausbeute im Rot und im Grun keinen Wert, spricht vielmehr die Vermutung aus, daß der Energieumsatz im ganzen Bereich des Spektrums gleich sei Diese Ansicht wird weder durch unsere Messungen, noch durch seine eigenen Messungen gestützt und ist auch nach den Erfahrungen der allgemeinen Photochemie wenig wahrscheinlich

Zahl der bei der Assimilation verbrauchten Quanten.

Wenn der chemische Mechanismus der Kohlensäureassimilation in den verschiedenen Spektralbezirken gleich ist — wofur vieles spricht —, so kann der Energieumsatz in den verschiedenen Spektralbezirken nicht gleich sein Gleich ware dann vielmehr die Zahl der an dem Vorgang beteiligten Elementarvorgange oder, nach der Lichtquantentheorie von PLANCK und EINSTEIN, die Zahl der bei der Spaltung eines Kohlensaure-molekuls verbrauchten Quanten Diese Betrachtungsweise hat den Vorzug, daß sie die Abnahme der spezifischen photochemischen Wirkung von Rot nach Blau hin erklart, denn die Energie eines Quantums ist im Rot kleiner als im Blau Die Betrachtungsweise hat den weiteren Vorzug, daß sie an Erfahrungen der allgemeinen Photochemie anknupft, denn E WARBURG[1] hat gefunden, daß bei der Photolyse der Halogenwasserstoffsauren durch Licht verschiedener Wellenlangen die Zahl der pro Molekul verbrauchten Quanten gleich ist also unabhangig von der Energie der Quanten

Zur Prufung unserer Annahme berechnen wir die Zahl der pro Molekul Kohlensaure verbrauchten Quanten aus den φ_0-Werten der Tabelle 1 (Spalte 3) und dem Energiegehalt von einem Mol Quanten ($N_0 h\nu$), der in den drei Versuchsspektralbezirken ist

im Rot (λ 660 $\mu\mu$)	43000 cal
„ Gelb (λ 578 $\mu\mu$)	49200
„ Blau (λ 436 $\mu\mu$)	65100

und finden daß

im Rot	4,4
„ Gelb	4,4
„ Blau	5,1

Quanten pro Molekul Kohlensaure verbraucht werden

Berechnet man die Quantenzahlen nicht aus den Mittelwerten von φ_0, die in der Tabelle angegeben sind sondern aus den gefundenen Hochstwerten so ist die Zahl der pro Molekul Kohlensaure verbrauchten Quanten

im Rot	4,1
„ Gelb	3,8
„ Blau	4,6

---

[1] Zeitschr. f Elektrochem **26**, 54 1920.

Berucksichtigt man die Fehlerquellen der Messungen, so ist die Zahl der pro Molekül Kohlensaure verbrauchten Quanten im Rot und Gelb gleich, namlich 4, im Blau großer, namlich 5. Die Quantentheorie erklärt also die Abnahme der spezifischen photochemischen Wirkung von Rot nach Gelb, wahrend die Abnahme von Gelb nach Blau großer ist, als nach der Quantentheorie zu erwarten ware. Wahrscheinlich spielt hierbei der Umstand eine Rolle, daß im Blau neben dem Chlorophyll die Begleitpigmente Xanthophyll und Caroten absorbieren

Photochemische Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll.

Bestrahlt man eine eosinhaltige Jodkaliumlösung unter Zutritt von Luft, so wird, wie W STRAUB[1] im Jahre 1904 fand, Jodkalium unter Abscheidung von Jod oxydiert Eosin ubertragt, wenn es belichtet wird, molekularen Sauerstoff Andere Beispiele photochemischer Sauerstoffubertragung wurden von TAPPEINER[2], JODLBAUER[2], NEUBERG[3], WILLSTÄTTER[4] und von NOACK[5] beschrieben

Wir untersuchten mit H GAFFRON die photochemische Sauerstoffubertragung durch organische Farbstoffe quantitativ, indem wir die übertragenen Sauerstoffmengen mit den absorbierten Strahlungsenergien verglichen Dabei zeigte sich, daß das Verhaltnis

$$\frac{\text{ubertragener Sauerstoff}}{\text{absorbierte Strahlungsenergie}}$$

von Rot und Blau hin abnimmt, ahnlich wie φ bei der Kohlensaureassimilation

Weiterhin zeigte sich, daß es Falle gibt, in denen das EINSTEINsche photochemische Äquivalentgesetz nahezu erfullt ist, so bei gewissen, von GAFFRON gefundenen Sauerstoffubertragungen durch Chlorophyll oder durch Hamatoporphyrin. In diesen Fallen wird fur jedes absorbierte Lichtquantum nahezu ein Molekul Sauerstoff ubertragen, wie die Tabelle auf folgender Seite zeigt

Die Tatsache, daß außerhalb der Zelle, unter einfachen experimentellen Bedingungen, die photochemische Wirkung des Chlorophylls proportional der Zahl der absorbierten Quanten ist, beweist, daß die quantentheoretische Behandlung des Assimilationsvorgangs berechtigt ist Denn so verschiedene Vorgange die photochemische Sauerstoff-

[1] Archiv exper Path. und Pharm 51, 383 1904

[2] Deutsches Archiv f klin Med 82, 250. 1905 Vgl auch Ergebnisse der Physiologie 8, 698. 1909.

[3] Diese Zeitschr. 13, 305. 1908, 61, 315. 1914

[4] Untersuchungen uber die Assimilation der Kohlensaure Berlin 1918

[5] Zeitschr. f Botanik, 17, 481. 1925

ubertragung durch Chlorophyll und die photochemische Kohlensaurereduktion durch Chlorophyll auch sind, so unzweifelhaft ist es, daß die photochemischen Primarreaktionen in beiden Fallen identisch sind

Tabelle 2. *Sauerstoffubertragung im Licht der gelben, grunen und blauen Quecksilberlinie.*

	Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	Ubertragener Sauerstoff (cmm) / absorb. Strahlungsenergie (cal.)	Zahl der ubertrag. O_2-Molekule / Zahl der absorbierten Quanten
Sauerstoffubertragung durch Chlorophyll	gelb	578	332	0,74
	blau	436	256	0,75
Sauerstoffubertragung durch Hämatoporphyrin	grun	546	338	0,79
	blau	436	276	0,81

Energieübertragung an Oberflächen.

Obwohl in der assimilierenden Zelle bis 60% der absorbierten Strahlungsenergie von den Pigmenten des Chlorophyllkorns auf die Kohlensaure ubertragen werden, ist eine solche Energieubertragung außerhalb der Zelle bisher nie nachgewiesen worden[1] Bestrahlt man kohlensaurehaltige Losungen von Chlorophyll oder anderen Farbstoffen mit Wellenlangen des sichtbaren Spektrums, so bleibt die Kohlensaure unverandert. Dies beweist, daß die Bedingungen unter denen die Energieubertragung in der assimilierten Zelle erfolgt verschieden sind von den Bedingungen die in kohlensaurehaltigen Farbstofflosungen herrschen

In der Tat laßt sich zeigen daß die Energieubertragung in assimilierenden Zellen kein Vorgang ist der sich in Losung abspielt[2] Bringt

[1] Entgegengesetzte Angaben der Literatur haben sich als unrichtig erwiesen Eine Kritik der alteren Angaben findet man bei WILLSTATTER und STOLL Untersuchungen uber die Assimilation der Kohlensaure Berlin 1918 Neuerdings gibt BALY an (BALY MORRIS HEILBRONN und BAKER Journ Chem Soc London **119**, 1025. 1921), daß bei Belichtung kohlensaurehaltiger Malachitgrunlosungen Spuren von Formaldehyd erhalten werden In der Arbeit von BALY wie in ahnlichen fruheren Arbeiten fehlt der Nachweis, daß die organische Substanz aus der Kohlensaure stammt, d h. der durch keinen anderen Versuch ersetzbare Versuch daß der Kohlensäuregehalt der Versuchsflussigkeiten bei der Bestrahlung abnimmt Daß Kohlensaure durch Ultraviolett der Wellenlange 200 $\mu\mu$ gespalten wird (BALY, l c), ist zwar eine an sich interessante Tatsache, hat aber mit der Wirkung der langen Wellen des sichtbaren Lichtes, die in assimilierenden Zellen die Kohlensaure spalten, nichts zu tun.

[2] Diese Zeitschr. **100**, 269 1919, **103**, 196 188

man in assimilierende Zellen chemisch indifferente Stoffe, die von festen Grenzflächen adsorbiert werden, so sinkt die spezifische photochemische Wirkung und kann bei geeigneter Konzentration des zugefügten Stoffes fast Null werden. Hierbei bleibt die Zelle am Leben, ihre Farbe unverändert. Die Lichtenergie wird also von der „narkotisierten" Zelle in normaler Weise absorbiert, aber nicht auf die Kohlensäure übertragen, sondern als Wärme von der Zelle wieder abgegeben.

Läßt man verschiedene chemisch indifferente Stoffe auf assimilierende Zellen einwirken und vergleicht ihre Wirkungsstärken, so findet man, daß sie mit den Adsorptionskonstanten wachsen. Je stärker ein Stoff adsorbiert wird, um so stärker hemmt er die Energieübertragung. Dieselben Stoffe hemmen, nach ihren Wirkungsstärken geordnet, in derselben Reihenfolge Reaktionen, die sich an der Oberfläche von Kohle abspielen. Es ist daraus zu schließen, daß die Energieübertragung bei der Kohlensäureassimilation ein Vorgang ist, der sich an Oberflächen abspielt.

Daß die Energie auf diese Weise auf die Kohlensäure übertragen und wieviel Energie dabei auf die Kohlensäure übertragen wird, ist kurz zusammengefaßt das Ergebnis unserer Arbeiten über die photochemische Reaktion bei der Kohlensäureassimilation.

Die Blackmansche Reaktion.

Von den Versuchen mit niedriger Strahlungsintensität gehen wir, indem wir das Zwischengebiet der Intensität überspringen, zu Versuchen mit hoher Strahlungsintensität über, bei denen die Bedingung $\frac{dv}{di} = 0$ erfüllt ist. Dann verschwindet der Einfluß der photochemischen Reaktion und wir haben es ausschließlich mit der BLACKMANschen Reaktion zu tun.

Dabei ist zu beachten, daß die Bedingung $\frac{dv}{di} = 0$ bei jeder Variation der Versuchsbedingungen bestehen bleiben muß. Finden wir, daß bei Zusatz irgendeiner Substanz die Assimilationsgeschwindigkeit von v auf v' sinkt, so dürfen wir die Wirkung der Substanz nur dann auf die BLACKMANsche Reaktion beziehen, wenn nicht nur

$$\frac{dv}{di} = 0,$$

sondern auch

$$\frac{dv'}{di} = 0$$

ist.

Hemmung der Blackmanschen Reaktion durch Narkotica.

Die BLACKMANsche Reaktion verhalt sich in einer Beziehung ahnlich wie die photochemische Reaktion. Auch die BLACKMANsche Reaktion wird durch chemisch indifferente Stoffe nach Maßgabe ihrer Adsorptionskonstanten gehemmt[1], auch die BLACKMANsche Reaktion ist also ein Vorgang, der sich an Oberflachen abspielt

Die Empfindlichkeit beider Vorgange gegen Narkotica ist ungefahr die gleiche und betrachtlich großer als die Empfindlichkeit der Atmung. So finden wir bei einer Phenylurethankonzentration von $0{,}5 \cdot 10^{-4}$ Molen/Liter eine starke Hemmung sowohl der photochemischen Reaktion als auch der BLACKMANschen Reaktion, während die Atmung erst durch die zehnfache Phenylurethankonzentration gehemmt wird

Hemmung der Blackmanschen Reaktion durch Blausäure Schwefelwasserstoff.

Abweichend von der photochemischen Reaktion wird die BLACKMANsche Reaktion durch Blausaure spezifisch gehemmt Um dies zu zeigen, teilen wir eine Chlorellasuspension in zwei Teile und fugen zu dem einen Teil Blausaure Bestrahlen wir stark, so finden wir in Blausaure die Kohlensaurezersetzung gehemmt, bestrahlen wir schwach so finden wir in Blausaure die Kohlensaurezersetzung normal und ungehemmt

Variieren wir die Blausaurekonzentrationen so sind die Hemmungen der BLACKMANschen Reaktion bei einer Blausaurekonzentration

von $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ Molen Liter	20%
„ $1{,}0 \cdot 10^{-4}$	55%
„ $1{,}0 \cdot 10^{-3}$	95%

Da Blausaure eine besondere Affinitat zu Schwermetall besitzt und Vorgange antikatalytisch hemmt[2] die Schwermetallkatalysen sind so schließen wir aus dem Verhalten der BLACKMANschen Reaktion gegen Blausaure daß eine Schwermetallkatalyse vorliegt Ist dies wahr so mussen auch andere Stoffe die mit Schwermetall reagieren die BLACKMANsche Reaktion hemmen

In der Tat hemmt Schwefelwasserstoff die BLACKMANsche Reaktion in sehr kleinen Konzentrationen Nach E NEGELEIN[3] sind die Hemmungen der BLACKMANschen Reaktion bei einer Schwefelwasserstoffkonzentration

von 10^{-6} Molen Liter	12%
„ 10^{-5}	72%
„ 10^{-4}	100%

[1] Nach Messungen von A v. RANKE, vgl diese Zeitschr **100**, 230 1919, **103**, 188. 1920.

[2] Ber d. deutsch chem. Ges. **58**, 1001 1925.

[3] Diese Zeitschr. **165**, 203 1925

ein Ergebnis, das, wie man fast sagen kann, den Schluß, den wir gezogen haben, beweist und jedenfalls durch keine andere Theorie erklart werden kann

Schon vor Jahren hat B Moore[1] die Vermutung geaußert, ein Schwermetall, namlich Eisen, spiele bei der Kohlensaureassimilation eine Rolle. Diese Vermutung, obwohl experimentell kaum begründet, war im ganzen richtig Unrichtig an ihr war die Idee, daß das Schwer-

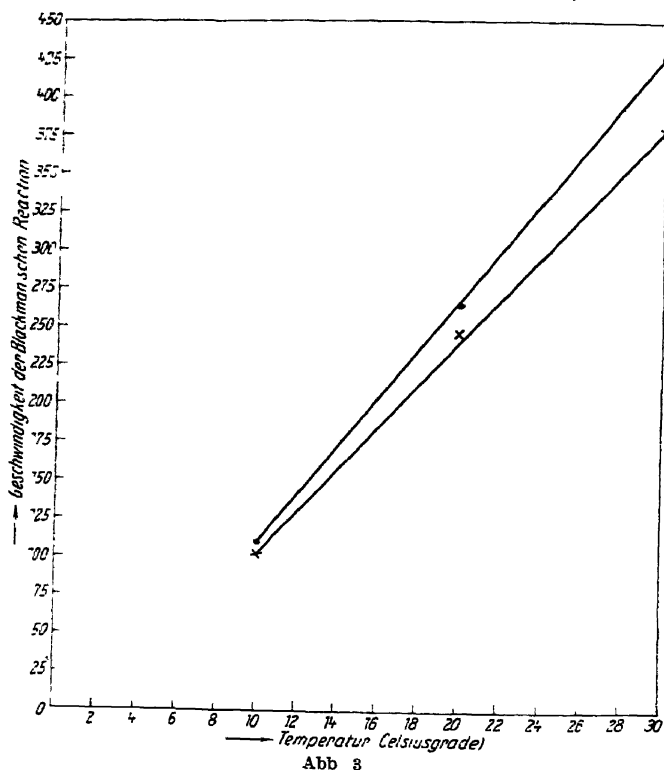



Abb 3

metall an der Absorption und Übertragung der Strahlungsenergie beteiligt sei, denn die photochemische Reaktion wird durch Blausaure nicht spezifisch gehemmt.

Der Einfluß der Temperatur.

Tragt man die Geschwindigkeit der Blackmanschen Reaktion v als Funktion der Temperatur ϑ in ein Koordinatensystem ein, so erhält man die Kurve der Abb 3 Zwischen 10 und 30° ist v nahezu eine lineare Funktion von ϑ, $\frac{dv}{d\vartheta}$ also konstant[2]

[1] Moore, B., Proc of the roy soc of London B 87, 556 1914.

[2] Nach Versuchen von Muneo Yabusoe, diese Zeitschr 152, 498. 1924

Im allgemeinen ist $\frac{dv}{d\vartheta}$ bei chemischen Reaktionen in Zellen nicht konstant, sondern nimmt mit steigender Temperatur stark zu. Statt $\frac{dv}{d\vartheta}$ ist oft $\frac{dv\,d\vartheta}{v}$ konstant, also log v eine lineare Funktion der Temperatur. Diesen „normalen" Einfluß der Temperatur finden wir beispielsweise für die Atmung der Chlorella (Abb. 4).

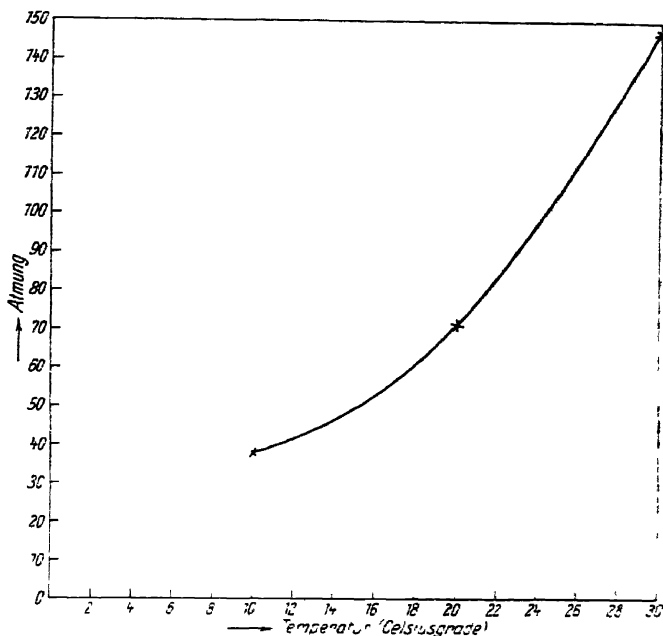



Abb. 4.

Vorbereitende oder fortführende Reaktion.

Fragen wir nach der Bedeutung der Blackmanschen Reaktion, so liegen von vornherein zwei Möglichkeiten vor: die Blackmansche Reaktion kann der photochemischen Reaktion vorangehen oder auf sie folgen, sie kann eine vorbereitende oder eine fortführende Reaktion sein.

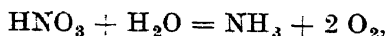
Wir nehmen zunächst an[1], daß sie eine vorbereitende Reaktion ist, in der die Kohlensäure chemisch verändert, etwa verestert oder amidiert wird („Akzeptortheorie"). Dann sollte es möglich sein, der Kohlensäure nahestehende Substanzen zu finden, die in der bestrahlten Zelle unter Entwicklung von Sauerstoff gespalten werden.

[1] Diese Zeitschr. **103**, 206. 1920.

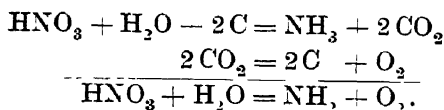
Zur Prüfung der Theorie bestrahlen wir Chlorella in kohlensäurefreier Salzlösung unter Zusatz von Kohlensäurederivaten, wie Kohlensäureestern, carbaminsauren Salzen, hochoxydierten Carbonsäuren usw., und finden, daß immer reichlich Sauerstoff entwickelt wird. Dieser Sauerstoff jedoch stammt, wie die nähere Untersuchung lehrt, nicht aus den zugesetzten Kohlensäurederivaten, sondern aus dem Nitrat und dem Wasser der Salzlösung.

Die Nitratassimilation.

Bestrahlt man Chlorella in nitrathaltigen Salzlösungen, so wird der Stickstoff des Nitrats unter Entwicklung von molekularem Sauerstoff zu Ammoniak reduziert, nach der Bilanzgleichung

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2,$$

ein Vorgang, der durch geeignete Maßnahmen so beschleunigt werden kann, daß seine Geschwindigkeit ein Mehrfaches von der Geschwindigkeit der Atmung beträgt.

Der Mechanismus dieses Vorganges ist ein anderer, als es nach der Bilanzgleichung scheint[1]. Zunächst haben wir eine Dunkelreaktion, in der die Salpetersäure mit Kohlenstoff der Zellsubstanz unter Bildung von Kohlensäure reagiert, wobei sie selbst bis zur Stufe des Ammoniaks reduziert wird. Es folgt bei Bestrahlung eine zweite Reaktion, in der der Kohlenstoff der Zellsubstanz unter Entwicklung von Sauerstoff regeneriert wird:

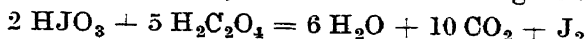
$$\begin{aligned} HNO_3 + H_2O + 2\,C &= NH_3 + 2\,CO_2 \\ 2\,CO_2 &= 2\,C + O_2 \\ \hline HNO_3 + H_2O &= NH_3 + O_2. \end{aligned}$$

So ist die Nitratassimilation mit einem Kreislauf des Kohlenstoffs verbunden, der über die Oxydationsstufe der Kohlensäure immer zum Kohlenstoff zurückführt, und kleine Mengen Kohlenstoff können beliebig große Mengen Nitrat zu Ammoniak reduzieren.

Die Reaktion zwischen Nitrat und dem Kohlenstoff der Zellsubstanz — die wir durch Verdunkelung von der zweiten Reaktion trennen — wird durch Schwermetallreagenzien spezifisch gehemmt. In n/10000 Blausäure[2] oder n/10000 Schwefelwasserstoff[3] ist eine Wirkung des Nitrats auf den Kohlenstoff der Zellsubstanz nicht mehr nachweisbar. Auch hier liegt also eine Schwermetallkatalyse vor. Das Metall — wahrscheinlich Eisen — überträgt den Sauerstoff des Nitrats auf den Kohlenstoff der Zellsubstanz.

---

[1] Diese Zeitschr. **110**, 66. 1920.
[2] Ebendaselbst **110**, 81. 1920.
[3] Negelein, E.: Ebendaselbst **165**, 203. 1925.

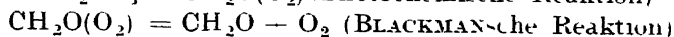
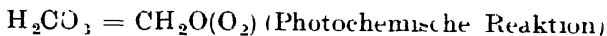
Ein einfaches Modell[1] einer derartigen Übertragung von gebundenem Sauerstoff ist die Oxydation der Oxalsaure durch Jodsaure Oxalsaure und Jodsaure reagieren in reinen wasserigen Losungen nicht miteinander. Fugt man aber minimale Mengen Eisensalz hinzu, so wird die Oxalsaure zu Kohlensaure oxydiert, nach der Bilanzgleichung:

$$2\,HJO_3 + 5\,H_2C_2O_4 = 6\,H_2O + 10\,CO_2 + J_2$$

Diese Reaktion wird, wie die Reaktion zwischen Nitrat und dem Kohlenstoff der Zellsubstanz, durch minimale Mengen Blausäure gehemmt. Blausäure bindet das Eisen und stellt damit den Zustand der Reaktionslosigkeit her, wie er in reinen Jodsaure-Oxalsaurelösungen herrscht[2].

Willstätters Theorie.

Bei den Versuchen, einen photochemisch reaktionsfahigen Korper zu finden, der nicht Kohlensaure ist, wurde der Weg entdeckt, auf dem die grune Pflanzenzelle das zum Aufbau ihrer Substanz notwendige Ammoniak gewinnt Aber auch dieser Weg fuhrt, wie sich gezeigt hat, uber die Kohlensaure So bleibt kein Versuch ubrig, der zugunsten der Akzeptortheorie spricht Wir wollen sie deshalb aufgeben und untersuchen, ob wir mit der Theorie, die BLACKMANsche Reaktion sei eine fortfuhrende Reaktion, weiter kommen

Die Auffassung, daß die BLACKMANsche Reaktion eine fortfuhrende Reaktion ist, vertreten WILLSTATTER und STOLL Nach WILLSTATTERS Theorie[3] wird in der photochemischen Reaktion das Hydrat der Kohlensaure in das isomere Formaldehydperoxyd umgelagert, in der BLACKMANschen Reaktion des Formaldehydperoxyd in Formaldehyd und molekularen Sauerstoff gespalten

$$H_2CO_3 = CH_2O(O_2) \quad \text{(Photochemische Reaktion)}$$
$$CH_2O(O_2) = CH_2O + O_2 \quad \text{(BLACKMANsche Reaktion)}$$

Die BLACKMANsche Reaktion ist hiernach vergleichbar mit der Spaltung von Wasserstoffperoxyd in Wasser und molekularen Sauerstoff der Katalysator der BLACKMANschen Reaktion gehort zu den Katalasen"

Vergleich von Wasserstoffperoxydspaltung und Blackmanscher Reaktion.

Um WILLSTATTERS Theorie zu prufen, bringen wir in Chlorella Wasserstoffperoxyd von dem die Alge kleine Konzentrationen ohne wesentliche Schadigung ertragt Es zeigt sich[4] daß die Alge Wasserstoffper-

[1] Chem. Ber. 58, 1010. 1925 (Versuche von SHIGERU TODA)

[2] *Zusatz beim Neudruck* Dies ist unrichtig. Vgl Seite 235 dieses Buches

[3] WILLSTATTER u STOLL: Untersuchungen uber die Assimilation der Kohlensaure, S. 241 bis 246. Berlin 1908.

[4] Diese Zeitschr 146, 486. 1924 (mit T UJESUGI)

oxyd in Wasser und Sauerstoff spaltet, wobei aus einer m/300-Wasserstoffperoxydlösung — in einer gegebenen Zeit und von einer gegebenen Algenmenge — im Dunkeln etwa ebensoviel Sauerstoff entwickelt wird, wie bei Bestrahlung in der BLACKMANschen Reaktion. Die peroxydspaltende Wirksamkeit der Alge reicht also aus, um die Geschwindigkeit der BLACKMANschen Reaktion zu erklären.

Weiterhin untersuchen wir, ob die Peroxydspaltung durch Chlorella dieselben besonderen Eigenschaften zeigt wie die BLACKMANsche Reaktion.

Zu den besonderen Eigenschaften der BLACKMANschen Reaktion gehört, daß ihre Geschwindigkeit zwischen 10 und 30° eine lineare Funktion der Temperatur ist. Nach Messungen von MUNEO YABUSOE[1]

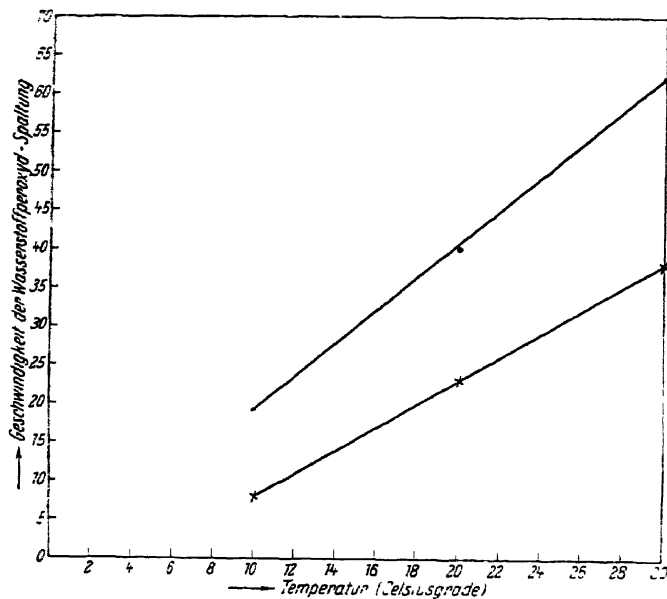



Abb. 5.

wird die Wasserstoffperoxydspaltung durch die Temperatur nach demselben Gesetz beschleunigt. Auch hier finden wir, daß die Geschwindigkeit zwischen 10 und 30° eine lineare Funktion der Temperatur ist (Abb. 5).

Eine zweite besondere Eigenschaft der BLACKMANschen Reaktion ist ihre große Empfindlichkeit gegenüber Blausäure. Ähnlich empfindlich gegenüber Blausäure ist die Wasserstoffperoxydspaltung, die durch 10^{-5} mol Blausäure deutlich gehemmt wird. Die Hemmungen der Wasserstoffperoxydspaltung bei verschiedenen Blausäurekonzentrationen betragen[2] bei einer Blausäurekonzentration von

[1] MUNEO YABUSOE, Diese Zeitschr. 152, 498. 1924.
[2] Diese Zeitschr. 146, 486. 1924 (mit T. UJESUGI).

von $0,5 \cdot 10^{-5}$ Mole Liter 32%
„ $1,0 \cdot 10^{-4}$ „ 83%
„ $1,0 \cdot 10^{-3}$ „ 93%

Vergleicht man diese Zahlen mit den für die BLACKMANsche gefundenen Hemmungen, so erkennt man die große Übereinstimmung. Die Übereinstimmung ist um so bemerkenswerter, als zwei andere Vorgänge in Chlorella — die photochemische Reaktion und die Atmung — selbst durch n/100 Blausäure nicht gehemmt werden.

Eine dritte besondere Eigenschaft der BLACKMANschen Reaktion ist ihre Empfindlichkeit gegen Narkotica. Ähnlich empfindlich gegen Narkotica ist die Wasserstoffperoxydspaltung. Dies zeigt Tabelle 3, in der die wirksamen Konzentrationen der Urethanreihe verzeichnet sind. Die Wasserstoffperoxydspaltung in Chlorella ist gegen Narkotica erheblich empfindlicher als die Atmung, und ungefähr ebenso empfindlich wie die BLACKMANsche Reaktion.

Tabelle 3.

Narkotikum	Hemmung der Atmung um 50% Millimole Liter	Hemmung der BLACKMANschen Reaktion um 50% Millimole Liter	Hemmung der H_2O_2-Zusetzung um 50% Millimole Liter
Methylurethan	1200	660	440
Äthylurethan	780	225	135
Propylurethan	100	73	80
Buthylurethan (iso)	43	26	27
Amylurethan (iso)	32	12	9
Phenylurethan	6	0,5	weniger als 1,5

Der Vergleich von BLACKMANscher Reaktion und Wasserstoffperoxydspaltung spricht durchaus zugunsten von WILLSTÄTTERS Theorie. Nehmen wir diese Theorie als die zurzeit wahrscheinlichste an, so wird auch die Rolle, die das Schwermetall in dem Assimilationsprozeß spielt, verständlich und zurückführbar auf Vorgänge, die sich außerhalb der Zelle abspielen. Denn seit THÉNARD und BERZELIUS ist bekannt, daß Oxyde der schweren Metalle Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff katalytisch spalten.

Assimilationsproblem

Trotz der in dieser Übersicht mitgeteilten Versuche und Ergebnisse ist und bleibt der Assimilationsvorgang problematisch, weil es nicht gelingt, Kohlensäure außerhalb der lebenden Zelle zu assimilieren, d. h. Kohlensäure mit den Wellenlängen des sichtbaren Spektrums außerhalb der Zelle zu spalten. Dies beweist, daß uns wesentliche Bedingungen, an die der Lebensvorgang gebunden ist, noch verborgen sind.

Biochem Zeitschr. 100, 230 1919

Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.

(Eingegangen am 16. Oktober 1919)

Mit 11 Abbildungen.

Nach den bisherigen Erfahrungen[1] ist die Fahigkeit der Pflanzenzelle, Kohlensaure photochemisch zu zersetzen, an die Intaktheit des Chlorophyllkorns gebunden „Sobald die Struktur des Chlorophyllkorns uberall zerstort ist...., hort die Moglichkeit der Sauerstoffproduktion sofort und definitiv auf" (TH. W. ENGELMANN[2]) Es entsteht so die Frage, welche Faktoren die photochemische Zersetzlichkeit der Kohlensaure in dem intakten Chlorophyllkorn bedingen

Um der Losung dieser Frage naher zu kommen, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche unternommen, die in ihrer Anlage eine Fortsetzung von Untersuchungen BLACKMANS[3] und WILLSTAETTERS[1] bilden.

Gegenuber fruheren Arbeiten wurde, wie ich glaube, die Technik der Versuche vereinfacht, sowohl durch die Wahl des Versuchsobjektes — einer kleinen, isoliert wachsenden Grunalge —, als auch durch Anwendung von Meßmethoden, die durch Umbildung der HALDANE-BARCROFTschen[4] Methode der Blutgasanalyse entstanden

In der vorliegenden ersten Mitteilung beschranke ich mich nach Moglichkeit auf die Beschreibung von Methoden und Tatsachen, spater soll dann auf den Zusammenhang der Tatsachen vom physikalisch-

[1] WILLSTAETTER u. STOLL · Untersuchungen uber die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

[2] Botan. Zeitg. 39, 441. 1881

[3] Zusammenfassung in „Optima and Limiting Factors". Annals of Botany 19, 281. 1905

[4] BARCROFT, J.· Ergebnisse der Physiologie 7, 690. 1908.

chemischen Standpunkt aus, d. h. auf die Kinetik der Kohlensäure-assimilation, näher eingegangen werden.

Die Wiedergabe der Versuche zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Züchtung und Eigenschaften der Alge.
II. Meßmethoden: Die Lichtquelle. Prinzip der Messungen. Ausführung der Messungen. Die rotierenden Sektorscheiben.
III. Einfluß der Kohlensäurekonzentration.
IV. Einfluß der Beleuchtungsstärke.
V. Einfluß der Temperatur.
VI. Einfluß intermittierender Beleuchtung.
VII. Einfluß permeierender Substanzen. Allgemeines. Versuche mit Blausäure. Versuche mit Phenylurethan.

I. Züchtung und Eigenschaften der Alge.

Für die Wahl des Organismus waren schnelles Wachstum, Unbeweglichkeit und einfacher Entwicklungszyklus maßgebend. Nach einigen Vorversuchen blieb ich bei einer runden, unbeweglichen, im Durchmesser 3—6 μ messenden grünen Alge, die sich ohne Bildung größerer Verbände oder beweglicher Sporen durch sukzessive Zweiteilung vermehrte, ähnlich der in der Literatur[1] als „Chlorella" beschriebenen Grünalge.

Wenn die Zelle auch durchweg grün erscheint, so ist doch anzunehmen, daß sie ein abgegrenztes Chlorophyllkorn[1] besitzt, das in Form einer fast geschlossenen Hohlkugel den farblosen Zelleib umgibt.

Die Alge wächst gut bei künstlicher Beleuchtung, sowohl auf Agar als auch in rein anorganischen Salzlösungen. Seit 10 Monaten züchte ich sie in KNOPscher Lösung unter Beleuchtung mit einer Metallfadenlampe, ohne daß bis jetzt Degenerationserscheinungen aufgetreten wären.

Nach einer Vorschrift von TOLLENS[2] hielt ich mir folgende Stammflüssigkeiten vorrätig:

1. 100 g Calciumnitrat
 25 g Kaliumnitrat
 15 g Natriumchlorid
 1000 ccm Wasser

2. 25 g Kaliumphosphat (primär)
 1000 ccm Wasser

3. 50 g Magnesiumsulfat
 1000 ccm Wasser

und gab je 10 ccm zu 1000 ccm Wasser, das aus Glas in Glas destilliert war. Zur Kultur wurden 2 ccm einer 0,3proz. Ferrosulfatlösung pro

---

[1] OLTMANNS, Morphologie und Biologie der Algen I, 1904, S. 183.
[2] KÜSTER: Kultur der Mikroorganismen 1913, S. 17.

Liter zugesetzt, während zur Messung der Assimilation KNOPsche Lösungen ohne Eisenzusatz verwendet wurden

Als Aussaat diente eine nach KOCHs Plattenverfahren gewonnene Einzelkultur, die zunächst steril weitergezüchtet wurde Später war steriles Arbeiten nicht mehr erforderlich, da in den anorganischen Nährflüssigkeiten, bei den hohen Beleuchtungsstärken und relativ großen Aussaaten weder Bakterien noch andere Algen aufkamen.

Die Lichtquelle, eine $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampe von 300 Watt Stromverbrauch, war in einem von fließendem Kühlwasser umgebenen Becherglas aufgehängt und brannte Tag und Nacht Ein langsamer Luftstrom, dem 4 Volumenteile Kohlensäure beigemengt waren, perlte dauernd durch die Kulturkolben und verhinderte die Sedimentierung der Zellen (Abb 1)

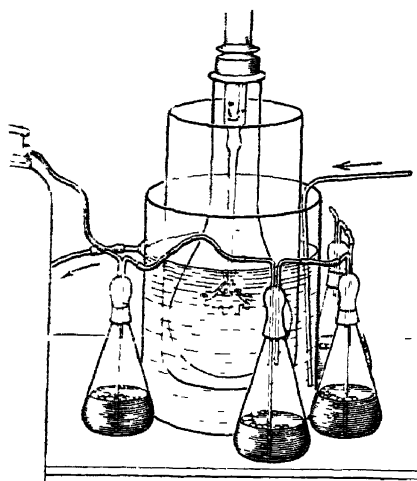



Abb 1

Bei einer mittleren Temperatur von 18° stieg die Zellenzahl im Laufe einiger Tage auf ein Mehrfaches der Aussaat, wobei die anfangs hellgrüne Kulturflüssigkeit allmählich schwarzgrün wurde Genauere Angaben über die Geschwindigkeit der Vermehrung haben wenig Interesse, sie ändert sich in komplizierter Weise mit der Zeit, indem mit fortschreitender Vermehrung innere Faktoren gegen äußere Bedingungen wie Beleuchtungsstärke, Suspensionsdichte und Form der Kulturkolben zurücktreten Die Vermehrung hört auf, wenn Gleichgewicht zwischen Assimilation und Atmung herrscht

Beziehen wir den Gaswechsel nach dem Vorgang von TH SAUSSURE[1] auf das Volumen des lebenden Organismus, so zersetzte die Alge unter günstigsten Bedingungen bei 25° in etwa 2 Minuten ein ihrem Eigenvolumen gleiches Volumen an Kohlensäuregas (0°, 760 mm); im Dunkeln schied sie unter sonst gleichen Bedingungen $^1/_{20}$ bis $^1/_{30}$ dieses Volumens an Atmungskohlensäure aus Assimilationsvermögen und Atmung stiegen bei Belichtung in Nährlösungen langsam an, entsprechend der Zunahme an Zellsubstanz

Das Assimilationsvermögen der Alge änderte sich zunächst nicht, wenn sie aus der Kulturflüssigkeit in destilliertes Wasser gebracht wurde

[1] Chemische Untersuchungen über die Vegetation in OSTWALDS Klassik. d. Naturwissensch. (Leipzig 1890)

oder in nicht zu konzentrierte Lösungen von freien Alkalien, Mineralsäuren, Alkali-, Erdalkali- oder Schwermetallsalzen, von Zuckern oder Aminosäuren. Erst im Laufe von Stunden oder Tagen trat in diesen Lösungen eine Schädigung ein, die an dem allmählichen Sinken des Assimilationsvermögens verfolgt werden konnte. Die Alge ist somit, ähnlich den Kokken unter den Bakterien, ein typischer Vertreter der Zellen mit unempfindlicher Grenzschicht.

Die Zeit, nach der sich die Schädigungen bemerkbar machen, wurde außerordentlich herabgesetzt durch kleine Mengen oberflächenaktiver Substanzen. So blieb die Alge in einer reinen Carbonat-Bicarbonatlösung, deren OH-Ionenkonzentration $10^{-4,8}$, betrug, tagelang intakt und von unverändertem Assimilationsvermögen, es genügte aber die Zugabe eines Krystalls des fast unlöslichen und in KNOPscher Flüssigkeit unschädlichen n-Dodecylalkohols, um die Zelle bei 25° fast sofort zu vergiften. Das Assimilationsvermögen erlosch dann innerhalb weniger Minuten, und bei Belichtung wurde kein Sauerstoff ausgeschieden, sondern mehr Sauerstoff verbraucht als im Dunkeln. Das Auftreten dieser „Photooxydation" war stets ein sicheres Zeichen der definitiven Zerstörung.

Wurde auch in den genannten Salzlösungen vielfach lange Zeit keine Schädigung bemerkbar, so unterblieb doch bald, wenn unentbehrliche Baustoffe fehlten, die Vermehrung und damit der für messende Versuche sehr störende Anstieg der Assimilation mit der Zeit. Diese Beobachtung wurde für die Methodik ausgenutzt und die Alge für längerdauernde quantitative Versuche nicht in KNOPscher Lösung, sondern in einseitig zusammengesetzten Salzlösungen suspendiert. Als besonders geeignet erwiesen sich Gemische von Carbonat- und Bicarbonatlösungen, die gleichzeitig als Kohlensäurequellen dienten.

Bemerkenswert war die große Resistenz gegen niedrige Temperaturen. Suspensionen in KNOPscher Lösung konnten wochenlang bei −5° aufbewahrt werden, ohne daß sich das Assimilationsvermögen änderte; stundenlange Kühlung in flüssiger Luft und darauffolgendes schnelles Auftauen brachte das Assimilationsvermögen nicht zum Verschwinden. Allerdings sank in einigen Fällen die Assimilationsleistung nach Vorbehandlung mit flüssiger Luft, stieg aber allmählich wieder auf ihre normale Höhe, ein Phänomen, das wohl zu denen von EWART[1] als „Assimilatory inhibition" beschriebenen gehört.

Vermutlich verdankt die Alge ihre Resistenz gegen tiefe Temperaturen der besonderen Lage ihres Chlorophyllkorns, das an die starre Zellulosehaut grenzt und bei einer plötzlichen Dehnung, wie sie beim Ge-

[1] The Journal of the Linnean Society, Botany, 31, 364. 1895 bis 1897.

frieren eintritt, vor Zerreißung geschützter ist als frei in der Zelle liegende Chlorophyllkörner. Algen mit freiliegenden Chlorophyllkörnern, wie Euglena viridis, büßten beim Gefrieren ihr Assimilationsvermögen völlig ein; die Chlorophyllkörner wurden hierbei breiter und zeigten deutliche Veränderungen ihrer Struktur.

II. Meßmethoden.

Die Lichtquelle.

Als Lichtquelle benutzte ich nach dem Vorgang WILLSTAETTERS[1] Metallfadenlampen, und zwar meist $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampen der Allgemeinen Elektrizitätsgesellschaft; sie wurden mit Gleichstrom (220 Volt) betrieben und brannten stets bei maximaler Belastung, auf die sich alle Angaben des Energieverbrauchs beziehen.

Nach Bestimmungen, die in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt mit einer meiner Versuchslampen ausgeführt wurden, änderte sich die Lichtstärke um 8%, wenn die Spannung von 220 auf 225 Volt stieg oder von 220 auf 215 Volt sank. Während der Assimilationsversuche konnte die Spannung mittels eines Regulierwiderstandes leicht innerhalb 2 Volt konstant gehalten werden, so daß die Schwankungen der Lichtintensität während eines Versuchs nicht mehr als 3% betrugen. Neue Lampen, deren Lichtstärken sich anfangs bei konstanter Spannung erheblich ändern, wurden stets vor ihrer Verwendung einige Stunden gebrannt.

Wie WILLSTAETTER[1] hervorhebt, erzielt man mit den im Handel befindlichen Lampen von 1500 Watt Stromverbrauch bei Annäherung auf etwa 15 cm an die zu beleuchtende Fläche Beleuchtungsstärken, die, photometrisch gemessen, die Helligkeit in direktem Sonnenlicht übertreffen. Auch die (bolometrisch gemessene) Energie der sichtbaren Strahlung, die unter gleichen Bedingungen auf 1 qcm beleuchteter Fläche auffällt, ist größer als in direktem Sonnenlicht[2].

Prinzip der Messungen.

Bei der Assimilation der Kohlensäure entsteht aus einem Volumen Kohlensäure ein Volumen Sauerstoff[3]. Schließt man grüne Zellen mit kohlensäurehaltiger Luft in einem Gefäß ab und belichtet, so bleibt

---

[1] WILLSTAETTER: l. c. Berlin 1918, S. 68.

[2] Nach LUX: Zeitschr. f. Beleuchtungswesen 20, H. 2 u. 3. 1914, beträgt die Ausbeute an sichtbarer Strahlung in cal für die $^1/_2$-Wattlampe 5% des Gesamtenergieverbrauchs.

[3] WILLSTAETTER: l. c. 315ff.

also im allgemeinen der Druck unverändert. Eine Druckänderung tritt jedoch auf, wenn

entweder das Flüssigkeitsvolumen gegen den Gasraum nicht klein ist, wobei dann die Differenz der Absorptionskoeffizienten der umgewandelten Gase wirksam wird,

oder die Kohlensäure einer in der Flüssigkeit gelösten chemischen Verbindung entnommen wird.

Auf beide Prinzipien lassen sich einfache Methoden zur Messung der Assimilation gründen.

Erstes Prinzip.

Wir denken uns ein luftdicht verschlossenes Gefäß zum Teil mit einer wässerigen Suspension grüner Zellen, zum Teil mit einem Gemisch von Sauerstoff- und Kohlensäuregas gefüllt und bei konstanter Temperatur so lange geschüttelt, bis Gleichgewicht zwischen dem Gasraum und der Flüssigkeit eingetreten ist. Es sei

v_G das Volumen des Gasraumes in ccm,
v_F das Volumen der Flüssigkeit in ccm,
P der Partialdruck des Sauerstoffs in mm Hg,
P_1 der Partialdruck der Kohlensäure in mm Hg,
T die Temperatur in absoluter Zählung,
α der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs für Wasser bei der Temperatur T,
α_1 der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure für Wasser bei der Temperatur T.

Dann erhält

der Gasraum $\frac{P v_G}{760} \cdot \frac{273}{T}$ ccm Sauerstoff . . . 0°, 760 mm

$\frac{P_1 v_G}{760} \cdot \frac{273}{T}$ ccm Kohlensäure . . . 0°, 760 mm

die Flüssigkeit $\frac{P v_F \alpha}{760}$ ccm Sauerstoff . . . 0°, 760 mm

$\frac{P_1 v_F \alpha_1}{760}$ ccm Kohlensäure . . . 0°, 760 mm

Bei der Belichtung sollen sich x ccm Kohlensäure in x ccm Sauerstoff umwandeln, wobei der Partialdruck des Sauerstoffs von P auf p steige, der Partialdruck der Kohlensäure von P_1 auf p_1 sinke. Nach der Belichtung enthält

der Gasraum $\frac{p v_G}{760} \cdot \frac{273}{T}$ ccm Sauerstoff . . . 0°, 760 mm

$\frac{p_1 v_G}{760} \cdot \frac{273}{T}$ ccm Kohlensäure . . . 0°, 760 mm

die Flüssigkeit $\frac{p v_F \alpha}{760}$ ccm Sauerstoff . . . . . . (0°, 760 mm)

$\frac{p_1 v_F \alpha_1}{760}$ ccm Kohlensäure . . . . . (0°, 760 mm)

Bezeichnen wir die Änderung des Gesamtdrucks in mm Hg mit H, so ist

$$H = (p - P) - (P_1 - p_1)$$

$$x = \frac{p - P}{760}\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha\right)$$

$$x = \frac{P_1 - p_1}{760}\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_1\right)$$

Nach Elimination von P, P_1, p und p_1

$$x = H\left[\frac{\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha\right)\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_1\right)}{760\, v_F (\alpha_1 - \alpha)}\right] \qquad (1)$$

x, die zersetzte Kohlensäuremenge, ist also proportional H, der Änderung des Gesamtdrucks, und unabhängig von den Anfangspartialdrucken an Sauerstoff und Kohlensäure.

Die Druckänderung wurde an einem Manometer abgelesen, dessen Sperrflüssigkeit die von Brodie[1] angegebene wässerige Lösung war, von der 10000 mm = 760 mm Hg. Das Volumen v_M der Manometercapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit war gegen v_G nicht zu vernachlässigen, die Druckänderung in dem Gefäß ergab sich aus der am Manometer beobachteten Druckänderung durch Multiplikation mit $\frac{v_G + v_M}{v_M}$, unter der Voraussetzung, daß sich die Gase der Capillare an dem Gasaustausch nicht beteiligten. Bezeichnen wir mit h die beobachtete Druckänderung in Millimetern Brodiescher Flüssigkeit, mit x_1 die zersetzten Kohlensäuremengen in Kubikmillimetern, so folgt aus (1)

$$x_1 = h\left[\frac{\frac{v_G + v_M}{v_G}\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha\right)\left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_1\right)}{10\, v_F (\alpha_1 - \alpha)}\right]. \qquad (2)$$

Der in der eckigen Klammer stehende Ausdruck ist für bestimmte Abmessungen und eine bestimmte Temperatur eine Konstante; er wird

[1] Barcroft, I.: Ergebn. d. Physiol. 7, 775. 1908.

für jedes Gefäß einmalig berechnet und ergibt die zersetzte Kohlensäuremenge in Kubikmillimetern für eine Druckänderung von 1 mm.

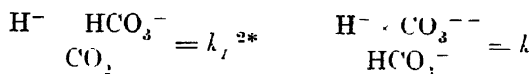
Betrug der Rauminhalt des Gefäßes 15 ccm, das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit 10 ccm, das Volumen der Manometercapillare bis zur Sperrflüssigkeit 1,2 ccm, so war die Konstante für 25° = 1. Dies waren ungefähr die Abmessungen bei der Ausführung der Versuche, so daß also 1 mm Druckänderung die Zersetzung von 1 cmm Kohlensäure anzeigte.

Während der Assimilation nimmt die Kohlensäurekonzentration in dem abgeschlossenen Gefäß ab. Diese Abnahme darf nicht so weit gehen, daß sie die Geschwindigkeit der Assimilation beeinflußt. Sättigte man mit 4 Volumprozent Kohlensäure bei dem Gesamtdruck von einer Atmosphäre, so enthielt das Gefäß einen Kohlensäurevorrat von 490 cmm Kohlensäure, erst wenn die Druckänderung etwa 490 mm betrug, war also der Kohlensäurevorrat erschöpft. Wurde der Versuch abgebrochen, wenn die Druckänderung nicht mehr als 200 mm betrug, so war man sicher, daß die Abnahme der Kohlensäurekonzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich (vgl. Abschnitt III) verminderte.

Voraussetzung der Methode ist, daß chemische Bindungen der Gase, wie die von Willstaetter[1] entdeckte Addition der Kohlensäure an die Blattsubstanz, gegen den Umsatz in der Assimilation zu vernachlässigen sind. Bei den außerordentlich kleinen Mengen an Zellsubstanz, die verwendet wurden — 1 bis 2 mg Substanz auf 10 ccm Flüssigkeit — konnte diese Voraussetzung stets als erfüllt betrachtet werden.

Zweites Prinzip.

Aus den beiden Gleichungen für die elektrolytische Dissoziation der Kohlensäure

$$\frac{H^{\cdot} \times HCO_3^-}{CO_2} = k_I \,[2*] \qquad \frac{H^{\cdot} \times CO_3^{--}}{HCO_3^-} = k_{II}$$

ergibt sich durch Division

$$\frac{(HCO_3^-)^2}{CO_3^{--} \times CO_2} = \frac{k_I}{k_{II}} = K \qquad (3)$$

[1] l. c. S. 172 und 226ff.

[2*] k_I = der wahren Dissoziationskonstante der Kohlensäure $\times \frac{H_2CO_3}{CO_2}$. Vgl. Thiel u. Strohecker: Ber. d. d. Chem. Ges. 47, 945, 1914.

Kennen wir in Mischungen von Bicarbonat- und Carbonatlosungen die Werte fur HCO_3^- und CO_3^{--}, so laßt sich, wenn K bekannt ist, die CO_2-Konzentration in jedem Fall berechnen.

Bezeichnen wir mit $NaHCO_3$ die Gesamtkonzentration des zugesetzten Bicarbonats, mit Na_2CO_3 die Gesamtkonzentration des zugesetzten Carbonats, beide in Molen pro Liter, mit α den Dissoziationsgrad des Bicarbonats $\left(\frac{HCO_3^-}{NaHCO_3}\right)$, mit β den Dissoziationsgrad des Carbonats $\left(\frac{CO_3^{--}}{Na_2CO_3}\right)$, so ergibt sich aus (3)

$$\frac{\alpha^2 (NaHCO_3)^2}{\beta\, Na_2CO_3 \times CO_2} = K$$

$$\frac{(NaHCO_3)^2}{Na_2CO_3 \times CO_2} = K\,\frac{\beta}{\alpha^2} = K'. \qquad (4)$$

Diese Gleichung wurde fur nicht zu verdunnte Losungen, in denen die Hydrolyse zu vernachlassigen ist, von Mc Coy[1], Auerbach und Pick[2] und Seyler und Lloyd[3] verifiziert.

K' ist konstant, wenn der Gesamt-Na-Gehalt konstant gehalten wird, variieren wir den Gesamtgehalt an Na, so andert sich $\frac{\beta}{\alpha_2}$, und damit auch K'

Bezeichnen wir mit c den Gesamtgehalt an Na in Milliaquivalenten pro Liter, so gilt fur das Gebiet zwischen $c = 100$ und $c = 1000$ bei 25^0 die empirische Formel

$$K' = 8739 - 1671 \log c \qquad (5)$$

Zur Berechnung der Kohlensaurekonzentration fur andere Temperaturen als 25^0 liegen keine Bestimmungen von K' vor doch laßt sich die Änderung von K' mit der Temperatur aus der Warmetonung des Bicarbonatzerfalls, die allerdings sehr ungenau bekannt ist, ungefahr berechnen Beim Zerfall von 2 Mol $NaHCO_3$ (gelost) in 1 Mol CO_2 (gelost) und 1 Mol Na_2CO_3 (gelost) werden 2028 cal absorbiert[4] Unter

---

[1] Amer Chem. Journ. 29, 437. 1903.

[2] Arbeiten aus d. Gesundheitsamt 38, 274. 1911

[3] Journ. Chem. Soc. London 111, 138 1917

[4] Landolt-Börnstein· Tabellen, S. 874 1912. Den Hinweis verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Prof F. Auerbach

der Annahme, daß sich die Dissoziationsgrade der Salze mit der Temperatur nicht merklich ändern, ergibt sich für die absolute Temperatur T

$$\log K'_{(T)} = \frac{\left(\frac{2028}{2 \times T} - \frac{2028}{2 \times 298}\right) + 2,3 \log K'_{(298)}}{2,3} \qquad (6)$$

In Tabelle 1 sind für 11 verschiedene Carbonatgemische und 3 verschiedene Temperaturen die Kohlensäurekonzentrationen nach den Gleichungen 4, 5 und 6 berechnet. Wird eine spätere genauere Bestimmung von K' auch Korrektionen der absoluten Werte von c_{CO_2} erforderlich machen, so dürften doch die relativen Werte von c_{CO_2} innerhalb einer Reihe auf etwa 10% genau sein

Tabelle 1

Nr. des Gemisches	Zusammensetzung des Gemisches		Millimole Na pro l	Für 5°		Für 10°		Für 25°	
	ccm $^1/_{10}$ molar Na_2CO_3	ccm $^1/_{10}$ molar $NaHCO_3$		K′	Mole CO_2 pro l	K′	Mole CO_2 pro l	K′	Mole CO_2 pro l
1	85	15	185	6400	$0,41 \cdot 10^{-6}$	6000	$0,44 \cdot 10^{-6}$	5000	$0,53 \cdot 10^{-6}$
2	80	20	180	6400	$0,78 \cdot 10^{-6}$	6000	$0,83 \cdot 10^{-6}$	5000	$1,0 \cdot 10^{-6}$
3	75	25	175	6400	$1,3 \cdot 10^{-6}$	6000	$1,4 \cdot 10^{-6}$	5000	$1,7 \cdot 10^{-6}$
4	70	30	170	6400	$2,0 \cdot 10^{-6}$	6000	$2,1 \cdot 10^{-6}$	5000	$2,6 \cdot 10^{-6}$
5	60	40	160	6500	$4,1 \cdot 10^{-6}$	6100	$4,4 \cdot 10^{-6}$	5100	$5,3 \cdot 10^{-6}$
6	50	50	150	6500	$7,7 \cdot 10^{-6}$	6100	$8,2 \cdot 10^{-6}$	5100	$9,8 \cdot 10^{-6}$
7	35	65	135	6700	$18 \cdot 10^{-6}$	6200	$19 \cdot 10^{-6}$	5200	$23 \cdot 10^{-6}$
8	25	75	125	6700	$33 \cdot 10^{-6}$	6200	$36 \cdot 10^{-6}$	5200	$43 \cdot 10^{-6}$
9	15	85	115	6800	$71 \cdot 10^{-6}$	6300	$76 \cdot 10^{-6}$	5300	$91 \cdot 10^{-6}$
10	10	90	110	6800	$120 \cdot 10^{-6}$	6300	$129 \cdot 10^{-6}$	5300	$150 \cdot 10^{-6}$
11	5	95	105	6900	$260 \cdot 10^{-6}$	6500	$274 \cdot 10^{-6}$	5400	$330 \cdot 10^{-6}$

Bringt man die grüne Alge aus ihrer Nährlösung in derartige Carbonat-Bicarbonatgemische, so tritt zunächst keine Schädigung ein die Zeit, bis die ersten Anzeichen einer Schädigung bemerkbar werden ist für die verschiedenen Gemische verschieden, und um so kürzer, je höher die OH-Ionenkonzentration Gemisch 9 mit einer OH-Ionenkonzentration von $10^{-4,8}$ läßt die Zellen bei tagelanger Einwirkung intakt Gemisch 1 — das Gemisch höchster OH-Ionenkonzentration — schädigt bei 25° schon bei 5- bis 6stündiger Einwirkung, bei 10° sehr viel langsamer Im allgemeinen wurde mit Gemisch 9 gearbeitet, mit den Gemischen 1—8 nur zur Lösung einer besonderen Fragestellung, wobei die Versuchszeiten einige Stunden nicht überschritten

Belichtet man die Alge in den Carbonatgemischen, so wird durch Zersetzung der Kohlensäure das Gleichgewicht gestört, es zerfällt neues

Bicarbonat in Carbonat und Kohlensaure, und die Konzentrationen der Salze — somit auch die Konzentration der Kohlensaure — ändern sich Ist der Kohlensaureverbrauch jedoch klein gegen die Menge der Salze, so fallt die Änderung der Konzentrationen nicht ins Gewicht und die Carbonatgemische spielen die Rolle von Puffergemischen im Sinne von L J HENDERSON[1] und SORENSEN[2].

Die „Resistenz" des am meisten benutzten Puffergemisches, des Gemisches 9, soll als Beispiel berechnet werden Für dieses Gemisch ist bei 25°

$$c_{NaHCO_3} = 0{,}085 \text{ Mole pro Liter}$$
$$c_{Na_2CO_3} = 0{,}015 \quad " \quad " \quad "$$
$$c_{CO_2} = 91 \times 10^{-6} \text{ Mole pro Liter}$$
$$K' = 5{,}3 \times 10^3 \quad " \quad " \quad "$$

Entziehen wir 10 ccm des Gemisches 0,2 ccm Kohlensaure, so nehmen wir pro Liter $0{,}9 \times 10^{-3}$ Mole Kohlensaure heraus, wobei die gleiche Zahl an Na_2CO_3 Molekulen entsteht, die doppelte Zahl an $NaHCO_3$ Molekülen verschwindet Aus Gleichung 4 berechnet sich

$$c_{CO_2} = \frac{(0{,}085 - 1{,}8 \times 10^{-3})^2}{(0{,}015 + 0{,}9 \times 10^{-3}) \times 5{,}3 \times 10^3} = 82 \times 10^{-6}.$$

c_{CO_2} sinkt also von 91×10^{-6} auf 82×10^{-6} oder um ca 10%

Berechnung der Assimilation.

Wir denken uns ein abgeschlossenes Gefaß zum Teil mit einem algenhaltigen Carbonatgemisch, zum Teil mit Luft gefullt Bei Belichtung sollen x cmm Kohlensaure in x cmm Sauerstoff umgewandelt werden

Bezeichnen wir mit

v_G das Volumen des Gasraumes in ccm,

v_F das Volumen der Flüssigkeit in ccm,

α[3] den Absorptionskoeffizienten des Sauerstoffs bei der Temperatur T,

T die Temperatur in absoluter Zahlung,

P den Partialdruck des Sauerstoffs vor der Belichtung,
p den Partialdruck des Sauerstoffs nach der Belichtung
} in mm Brodiescher Flussigkeit

[1] Ergebnisse der Physiologie 8, 254. 1909.

[2] Ergebnisse der Physiologie 12, 393. 1912

[3] Fur α ist ohne merklichen Fehler stets der Absorptionskoeffizient in Wasser zu setzen. Über die Abweichungen vgl. GEFFKEN, Zeitschr f physikal. Chem. 49, 257. 1904.

so ist

$$x = p - P \left[\frac{v_G \frac{273}{T} - v_F \alpha}{10} \right],$$

oder, wenn $(p - P) = h$ gesetzt wird

$$x = h \left[\frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha}{10} \right]. \qquad (7)$$

x ist also proportional h und unabhängig vom Anfangs-Partialdruck des Sauerstoffs.

Der eingeklammerte Ausdruck ist für bestimmte Abmessungen und eine bestimmte Temperatur eine Konstante, er wird für jedes Gefäß einmalig berechnet und ergibt die entwickelte Sauerstoffmenge in cmm für eine Änderung des Sauerstoffpartialdrucks von 1 mm.

Die beobachtete Druckänderung war ohne merklichen Fehler gleich h, der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, zu setzen, indem die Änderung des Kohlensäurepartialdrucks nicht ins Gewicht fiel. Wurde $v_G = 5$, $v_F = 10$ gemacht, so ergab sich für die Konstante bei 25° der Wert von 0,5, das heißt, wenn 0,5 cmm Kohlensäure zersetzt wurden, änderte sich der Sauerstoffpartialdruck um 1 mm, oder um 400 mm, wenn 200 cmm Kohlensäure zersetzt wurden. Der Kohlensäurepartialdruck des Carbonatgemisches 9 ist bei 25° = 0,27 · 10^{-2} Atmosphären oder = 27 mm unserer Manometerflüssigkeit, er änderte sich nach der gegebenen Berechnung um 10% oder 3 mm, wenn aus 10 ccm des Gemischs 200 cmm Kohlensäure fortgenommen wurden. Die Änderung des Kohlensäurepartialdrucks beträgt also weniger als 1% von der Änderung des Gesamtdrucks, ist mithin zu vernachlässigen. Noch günstiger liegen die Verhältnisse für die resistenteren Carbonatgemische mittlerer Zusammensetzung.

Was den Einfluß auf die Geschwindigkeit der Assimilation betrifft, so fällt eine Änderung des Kohlensäurepartialdrucks um so mehr ins Gewicht (vgl. Abschnitt III), je niedriger der Anfangsdruck ist. In allen Fällen ließen sich die Versuche so anordnen, daß der Kohlensäureverbrauch die Geschwindigkeit nicht merklich verminderte.

Ausführung der Messungen.

Eine mehrtägige Kultur wurde aus den Kolben (Abb. 1) in ein Zentrifugierglas gespült und zunächst einige Minuten bei niedriger Tourenzahl zur Entfernung von Salzniederschlägen zentrifugiert. Die in der überstehenden Flüssigkeit befindlichen Zellen wurden dann zweimal auf

der Zentrifuge bei hoher Tourenzahl mit KNOPscher Lösung gewaschen, für Versuche mit Carbonatgemischen zuletzt mit $1/10$ molar $NaNO_3$-Lösung, damit beim Eingießen in die Carbonatgemische keine Niederschläge entstanden.

Die geeignete Dichte der Suspensionen wurde zunächst durch Vorversuche bestimmt. war dies einmal geschehen, so wurden Standardsuspensionen von bekanntem Assimilationsvermögen im Eisschrank aufbewahrt und späterhin frische Kulturen durch colorimetrischen Vergleich mit den Standardsuspensionen auf passende Verdünnungen gebracht Man sparte so die täglichen Vorversuche; selbstverständlich aber durften Messungen nicht auf gleiche Färbungen bezogen werden, sondern nur auf gleiche Zellmengen ein- und derselben Suspension Jeder Versuch stellte, mit allen erforderlichen Kontrollen, ein in sich abgeschlossenes Ganze dar. die Kenntnis absoluter Werte war in keinem Fall erforderlich.

Die Assimilation wurde bestimmt als Differenz der Druckänderungen, die in einem belichteten und einem verdunkelten Gefäß auftraten[1]. „Dunkel-" und „Hellgefäß" waren gleich groß und mit gleichen Mengen Zellsuspension beschickt. sie unterschieden sich voneinander nur dadurch, daß das eine eine Metallhülse zur Abblendung des Lichts trug. War die Atmung nicht klein im Vergleich zur Assimilation, so wurde sie vielfach nicht nur gleichzeitig mit der Assimilation, sondern auch vorher und nachher gemessen[2]

Alle Versuche wurden in Wasserthermostaten ausgeführt deren Temperatur auf $1/10$ Grad konstant gehalten werden konnte Auch bei höchster Beleuchtungsstärke entstanden zwischen Thermostatenwasser und den Zellsuspensionen keine größeren Temperaturdifferenzen, als $1/10$ Grad

Die Fehler, die durch die Abmessung der Zellen entstanden, waren die Ablesungsfehler der Pipetten, der Fehler einer Druckmessung betrug etwa $1/2$ mm. Weder diese Fehler, noch Unsicherheiten durch Schwankungen der Lichtstärke (vgl den Anfang dieses Abschnitts) kamen in Betracht gegen Schwankungen der Leistung infolge der Inkonstanz innerer Faktoren Im allgemeinen blieb die Leistung, wenn die Vermehrung verhindert wurde, unter konstanten äußeren Bedingungen während der Versuche innerhalb 5% konstant, doch wurden vereinzelt auch Schwankungen bis zu 20% beobachtet. Wenn irgend möglich,

---

[1] Dieses Verfahren ist nicht unter allen Umständen richtig; in einer späteren Mitteilung wird gezeigt werden, daß der Atmungsprozeß in der belichteten Zelle rückgängig gemacht wird, ehe sich Kohlensäure bildet.

[2] Vgl. hierzu KREUSLER: Landwirtsch Jahrbücher 14, 913 1885.

wurden deshalb am Schluß eines Versuches die Anfangsbedingungen wieder hergestellt, um festzustellen, wie weit die Leistung unter gleichen Bedingungen als konstant zu betrachten war.

Es folgt nunmehr die Beschreibung der einzelnen Anordnungen, die Verfahren zur Messung sowohl der Atmung, als auch der Assimilation sind und sich im Anschluß an früher beschriebene Methoden entwickelt haben[1]. Als Manometer benutzte ich die HALDANE-BARCROFTschen Blutgasmanometer[2], die sich wiederum, wie schon früher bei den Atmungsstudien, ausgezeichnet bewährt haben[3].

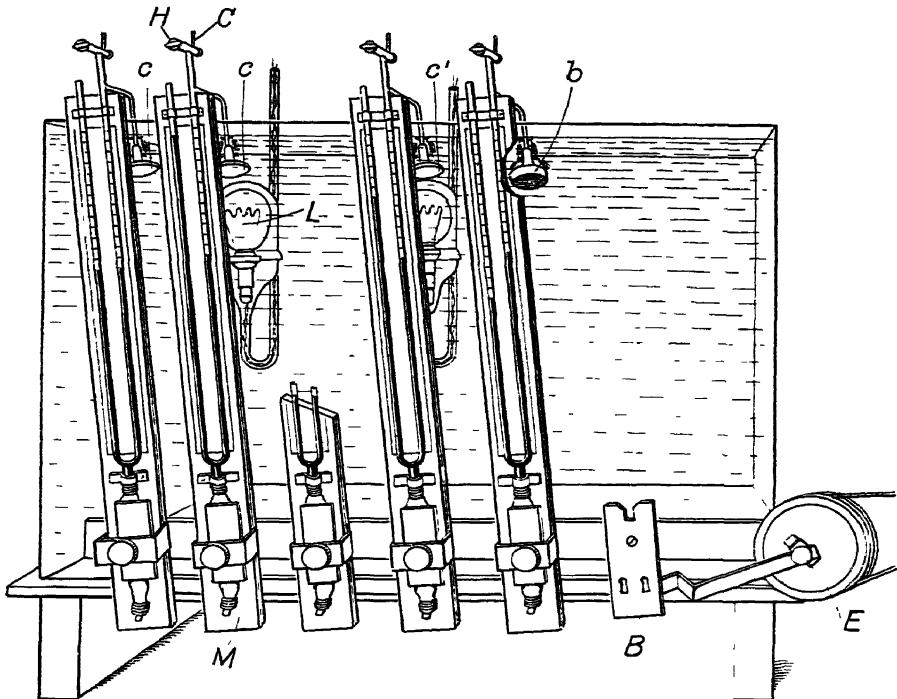



Abb. 2.

Anordnung I (Abb. 2). Die Lichtquellen $^1/_1$ Watt-Metallfadenlampen von 40 Watt Stromverbrauch, sind in wasserdichten Glasgehäusen in das Wasser des Thermostaten versenkt; ihr leuchtender Faden kann den Assimilationsgefäßen c' bis auf 4 cm genähert werden.

[1] SIEBECK. In Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden 1915.

[2] BARCROFT, J.: Ergebnisse der Physiologie 7, 699. 1908.

[3] Die Glasgefäße wurden von der Firma HANFF & BUEST, Berlin, Luisenstraße, die übrigen Geräte von den Mechanikern SCHLÜDER und NEGELEIN, Berlin-Dahlem, Boltzmannstraße, hergestellt.

Der Rauminhalt der Assimilationsgefäße (Abb. 3) beträgt etwa 15 ccm. Zum Versuch werden sie mit je 10 ccm Zellsuspension beschickt und durch einen Glasschliff mit den Manometern verbunden Arbeitet man mit KNOPscher Lösung, so wird von C aus bei geöffnetem Hahn H (Abb. 2) Luft mit Zusatz von 4 Volumprozent Kohlensäure eingeleitet, arbeitet man mit Carbonatgemischen, so fällt die Gaseinleitung fort. Manometer und Gefäße werden darauf in den Thermostaten eingehängt und bei geöffneten Hähnen H 10 Minuten durch Bewegen der Exzenterscheibe E geschüttelt, bis Temperatur- und Druckgleichgewicht eingetreten ist. Dann unterbricht man das Schütteln, stellt die Sperrflüssigkeit der Manometer auf eine bestimmte Marke ein, schließt die Hähne H und entzündet die Lampen unter den „Hellgefäßen". Die „Dunkelgefäße" b tragen Metallkappen zum Schutze gegen seitliche Be-

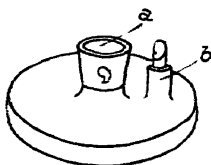
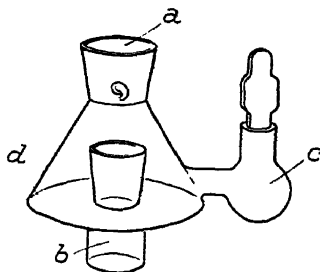



Abb 3 Abb 4

leuchtung. c ist ein „Leergefäß" und dient als Thermobarometer Unter fortgesetztem Schütteln beobachtet man nunmehr die Druckänderungen, nachdem sie eine passende Höhe erreicht haben, unterbricht man das Schütteln, stellt die Sperrflüssigkeit auf ihren Anfangsstand ein und erhält so die Druckänderungen bei konstantem Volumen, die durch den Ausschlag des Thermobarometers auf die Anfangstemperatur und den Anfangsaußendruck korrigiert werden Die korrigierten Druckänderungen, mit den Gefäßkonstanten multipliziert (Gleichung (2) oder (7)) ergeben den Gaswechsel im Hellen und Dunkeln, die Differenz dieser Werte ist gleich der Assimilation.

Ein Vorzug der Anordnung ist die Möglichkeit, in kurzen Intervallen abzulesen und so den „Gang" der Prozesse zu beobachten; ein Nachteil, daß jedes einzelne Assimilationsgefäß durch eine gesonderte Lichtquelle beleuchtet wird Die Anordnung eignet sich im wesentlichen für Beeinflussungsversuche bei hohen Beleuchtungsstärken, bei denen erhebliche Unterschiede in der Beleuchtung die Assimilationsleistung nicht ändern

Anordnung II unterscheidet sich hinsichtlich der Apparatur von Anordnung I nur durch die Form der Assimilationsgefäße (Abb 4)

Der Rauminhalt der Gefaße betragt etwa 15 ccm, die Zellsuspensionen, 1—2 ccm, werden auf den flachen Boden gebracht Der Tubus *b* dient zur Aufnahme von Absorptionsmitteln, aus dem Ansatz *c* konnen der Zellsuspension, ohne daß die Messung unterbrochen wird, Substanzen zugefügt werden.

Ist der Gasraum mit Luft, der Tubus *b* mit verdunnter Kalilauge gefullt, so wird der Gasraum frei von Kohlensaure gehalten und das Manometer zeigt nur Änderungen des Sauerstoffdrucks an; ist der Gasraum mit Kohlensaure und einem indifferenten Gas, wie Stickstoff oder Wasserstoff, gefüllt, der Einsatz *b* mit einer sauerstoffabsorbierenden Flüssigkeit, so wird der Gasraum frei von Sauerstoff gehalten und das Manometer zeigt nur Änderungen des Kohlensauredrucks an. Bedeckt man den Boden *d* des Gefaßes mit lebenden grunen Zellen und belichtet, so wird im ersten Fall dem Gasraum um so viel weniger Sauerstoff entnommen, als im Assimilationsprozeß entsteht, die Druckanderung ist im Hellen geringer als im Dunkeln, im zweiten Fall ist die Druckanderung im Dunkeln Null; bei Belichtung erscheint ein negativer Druck, entsprechend einem Verbrauch an Kohlensäure

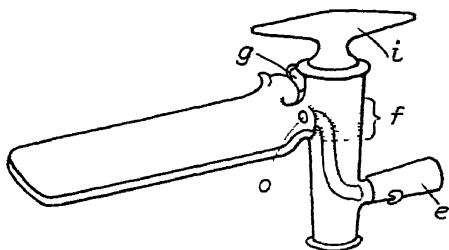



Abb 5

Die Anordnung diente zur Losung von Fragenstellungen, die im folgenden nicht berührt sind

Anordnung III Das Assimilationsgefaß (Abb 5), dessen Rauminhalt etwa 15 ccm betragt, wird durch den Schliff *e* mit dem HALDANE-BARCROFTschen Manometer verbunden, von dem Tubus *g* aus mit der Zellsuspension, meist 10 ccm, beschickt. Sattigung mit Gasen erfolgt indem man bei *g* ein bis auf den Boden des Gefaßes reichendes Glasrohrchen einfuhrt. Der bei *F* nicht eingefettete Hahn *i* ermoglicht es, das Assimilationsgefaß gasdicht zu verschließen und die Belichtung getrennt von dem Manometer vorzunehmen

In dem „Meßthermostaten" wird zunachst durch Schutteln Temperatur- und Druckgleichgewicht herbeigefuhrt Dann schließt man den Hahn *i* unter Wasser, trennt das Gefaß von dem Manometer und befestigt es auf einer sich langsam drehenden Scheibe in dem „Belichtungsthermostaten", einer Wanne aus Eisenblech, die einen durch eine Spiegelglasscheibe verschlossenen Ausschnitt tragt (Abb. 6)

Die Lichtquelle, eine $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampe, ist außerhalb des Belichtungsthermostaten aufgehangt, in den Versuchen mit den rotierenden Sektorscheiben schaltet man zwischen Lichtquelle und Assimila-

tionsgefäß ein Kondensorsystem (Abb. 6), im übrigen wird ohne Linsen gearbeitet. In den Versuchen mit variierenden Beleuchtungsstärken steht die Lichtquelle fest, der Belichtungsthermostat ist auf einer Schiene verschiebbar; das reflektierte Licht wird, wie in der Photometrie üblich, durch geschwärzte Schirme von dem Assimilationsgefäß ferngehalten.

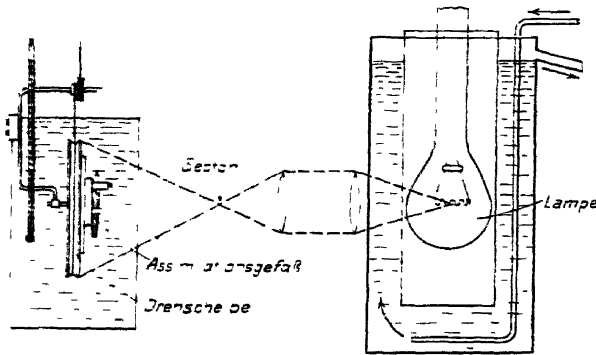



Abb. 6

Nach einer passenden Zeit entfernt man das Assimilationsgefäß von der Drehscheibe, verbindet mit dem Manometer, hängt in den Meßthermostaten ein und öffnet, nachdem Temperaturgleichgewicht eingetreten ist, den Hahn *i*. Der hierbei auftretende Druck wird mittels eines Thermobarometers auf konstante Anfangsbedingungen reduziert. Die reduzierte Druckänderung, mit der Gefäßkonstante (Gleichung (2) oder (7)) multipliziert, ergibt den Gaswechsel, die Differenz des Gaswechsels im Hellen und Dunkeln die Assimilation.

Die Anordnung ist von den beschriebenen die genaueste und hat sich im Lauf von über 1000 Messungen bewährt. Durch die Möglichkeit, die Belichtung getrennt von dem Manometer vorzunehmen, wird die Freiheit der Experimente außerordentlich erweitert, ohne daß sich irgendwelche Nachteile ergeben hätten. Werden mehrere Assimilationsgefäße symmetrisch zur Lichtquelle auf der Drehscheibe befestigt, so sind die Beleuchtungsverhältnisse für die verschiedenen Gefäße völlig gleich und der Einfluß variierender Beleuchtungsstärken auf verschieden behandelte Zellen kann in sehr genauer Weise ermittelt werden.

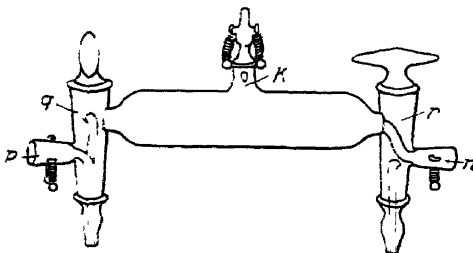



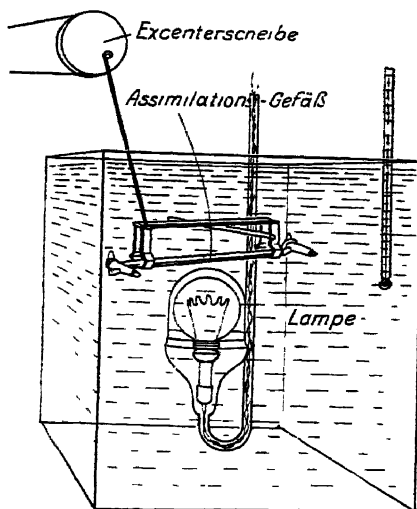
Abb. 7

Anordnung IV. Der Rauminhalt des Assimilationsgefäßes (Abb. 7) beträgt 15—20 ccm. Zum Versuch füllt man durch den Tubus einige Kubikzentimeter Zellsuspension ein, setzt bei p und w rechtwinklig gebogene Gaszu- und -ableitungsröhren an, versenkt das Ganze in einen Wasserthermostaten, leitet bei geöffneten Hähnen q und r unter stan-

digem Schutteln 10 Minuten eine Gasmischung bekannter Zusammensetzung durch schließt dann die Hahne und bringt das Gefaß in den Belichtungsthermostaten (Abb. 8).

Abb 8

Die Lichtquelle ist eine $^1/_1$-Watt-Metallfadenlampe von 40 Watt Stromverbrauch, ihr leuchtender Faden kann bis auf etwa 4 cm dem Assimilationsgefaß genähert werden.

Während des Versuchs wird das Assimilationsgefäß durch die Exzenterscheibe geschuttelt. Nach einer passenden Zeit nimmt man das Gefaß heraus, verbindet es mit einem HALDANEschen Analysenapparat und ermittelt die Zusammensetzung des Gasinhalts in bekannter Weise. Auf den Hellversuch folgt der Dunkelversuch, aus der Differenz des Gaswechsels im Hellen und Dunkeln ergibt sich die Assimilation

Die Anordnung ist umstandlicher als I, II und III und diente lediglich zur Kontrolle der Druckverfahren

Die rotierenden Sektorscheiben.

Zur periodischen Erhellung und Verdunkelung in kurzen Intervallen wurden zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefaß rotierende Scheiben eingeschaltet, die mit einem oder mehreren Ausschnitten versehen waren (Abb 9) Der Umfang der Ausschnitte war in allen Fallen gleich dem halben Scheibenumfang, so daß wahrend einer Umdrehung die Halfte des Lichts abgeschnitten wurde

Abb 9

Als Antrieb diente ein Gleichstrommotor Die Tourenzahl wurde zwischen 2 und 2000 pro Minute variiert und mittels eines Zahlers oder nach der Stimmgabelmethode gemessen Bezeichnen wir mit T die Tourenzahl der Scheibe pro Minute, mit S die Zahl der Scheibenausschnitte, so war die Dauer einer Verdunkelung oder Erhellung

$$t = \frac{60}{T \times 2S} \text{ Sekunden.} \qquad (9)$$

Als Lichtquelle diente eine $1/2$-Watt-Metallfadenlampe von 1500 Watt Stromverbrauch, ihr leuchtender Draht wurde in der Ebene der vertikal stehenden Sektorscheibe so abgebildet, daß die Hohe des Bildes etwa 1,2 cm betrug

Rotiert die Scheibe, so liegen zwischen den Perioden volliger Erhellung und Verdunkelung Übergangsperioden zunehmender und abnehmender Helligkeit, diese mussen nach Moglichkeit verkleinert werden und fallen um so weniger ins Gewicht, je kleiner das Lichtquellenbild im Vergleich zu dem Umfang eines Scheibenausschnittes. Bei einem Scheibendurchmesser von 50 cm betrug die Übergangsperiode fur die zweiteilige Scheibe 2%, fur die achtteilige Scheibe 8% der reinen Erhellungs- oder Verdunkelungsperiode Kam es nicht auf Erzielung besonders kurzer Perioden an, so wurde stets mit der zweiteiligen Scheibe gearbeitet

III. Einfluß der Kohlensäurekonzentration.

Mittels der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Carbonatgemische wurden 8 verschiedene Kohlensaurekonzentrationen hergestellt, die zwischen $0{,}53 \cdot 10^{-6}$ und $91 \cdot 10^{-6}$ Molen pro Liter lagen Die Konzentration, die mit 0,03 Volumprozent oder dem normalen Kohlensaureteildruck der Atmosphare im Gleichgewicht ist, betragt bei 25° und fur Wasser etwa $10 \cdot 10^{-6}$, so daß also die Konzentrationen von $^1/_{20}$ bis auf das 10fache der atmospharischen Sattigungskonzentration variiert wurden

Gleiche Zellmengen werden zu gleichen Volumina der verschiedenen Carbonatgemische gegeben, und die Assimilationsleistungen in je 10 ccm bei hoher und konstanter Beleuchtungsstarke nach Anordnung III bestimmt

Tabelle 2.

Beleuchtungsstärke 16[1]. 25° 1 mm = 0,67 cmm CO_2

Nr des Carbonatgemischs[2]	C_{CO_2} = in Molen pro Liter	Dauer des Versuchs in Minuten	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Assimilation in mm pro Stunde
1	$0{,}53 \cdot 10^{-6}$	60	29	**29**
2	$1{,}0 \cdot 10^{-6}$	60	47	**47**
4	$2{,}6 \cdot 10^{-6}$	30	60	**120**
5	$5{,}3 \cdot 10^{-6}$	30	72	**144**
6	$9{,}8 \cdot 10^{-6}$	30	89	**178**
7	$23 \cdot 10^{-6}$	30	101	**202**
8	$43 \cdot 10^{-6}$	30	107	**214**
9	$91 \cdot 10^{-6}$	30	121	**242**

Tabelle 2 und die graphische Darstellung Abb. 10 zeigen, daß die Assimilationsgeschwindigkeit bei niedrigen Kohlensaurekonzentrationen

[1] Vgl Abschnitt IV [2] Vgl. Tabelle 1.

nahezu proportional der Kohlensäurekonzentration wächst, bei höheren Kohlensäurekonzentrationen, etwa von $2 \cdot 10^{-6}$ Molen pro Liter an, entspricht einem bestimmten Zuwachs der Konzentration ein stetig kleiner werdender Zuwachs der Assimilationsgeschwindigkeit, die schließlich unabhängig von der Konzentration wird.

Die Form der Kurve wird verständlich, wenn wir die Geschwindigkeit der Assimilation proportional der Konzentration der Kohlensäure und der Konzentration eines zweiten Stoffes setzen, mit dem die

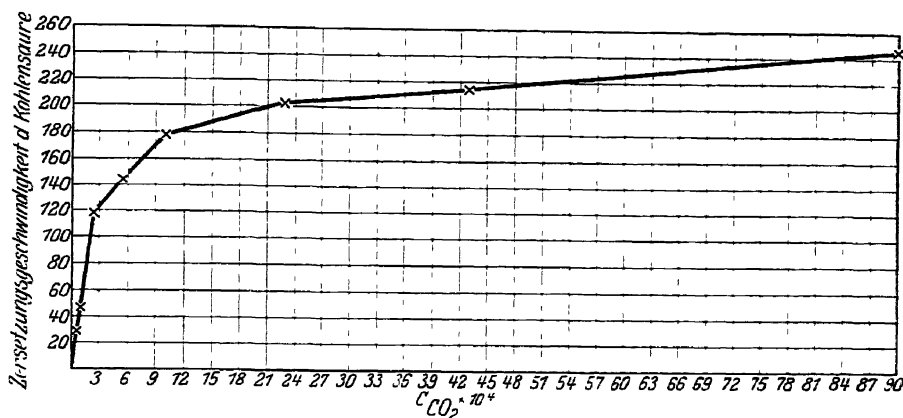



Abb 10

Kohlensäure reagiert[1] Bezeichnen wir mit A die in der Zelle vorhandene Gesamtmenge dieses zweiten Stoffes, mit x und $A - x$ die jeweils in freiem und gebundenem Zustand vorhandenen Mengen, mit c_{CO_2} die Konzentration der Kohlensäure, so wäre im stationären Zustand $\frac{c_{CO_2} \cdot x}{A - x}$ konstant

Hierbei nehmen wir also an, daß die Geschwindigkeit der Assimilation bei allen, auch den niedrigsten Kohlensäurekonzentrationen nicht durch die Diffusion, sondern durch eine chemische Reaktion bestimmt wird Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht, daß bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen eine Temperatursteigerung von 10° die Assimilationsgeschwindigkeit etwa vervierfachte bis verfünffachte (vgl Abschnitt V)

[1] Vgl hierzu die Entdeckung WILLSTAETTERS (l. c S. 172 u. 226ff.), daß die Kohlensäure mit Bestandteilen grüner Zellen chemische Verbindungen eingeht

Die Konzentrationsgeschwindigkeitskurven, die früher[1] in Versuchen an grünen Blättern erhalten wurden, zeigen recht erhebliche Abweichungen von der Form unserer Kurve, so geht nach BLACKMAN[1] die gerade ansteigende Linie, die dem Gebiet proportionalen Wachstums entspricht, durch einen scharfen Knick in eine zur Abszissenachse parallele Linie über. In diesen sowohl als auch in den übrigen früher beschriebenen Versuchen bestand jedoch bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen zwischen der Außenkonzentration und der Konzentration an den Reaktionsorten kein Gleichgewicht, so daß die Assimilationsgeschwindigkeit vorwiegend oder zum Teil durch die Diffussion bestimmt wurde. In der Formel für die Assimilationsgeschwindigkeit im stationären Zustand kommt dann eine Konstante hinzu und das Abhängigkeitsverhältnis wird ein komplizierteres als in unserem Fall

IV. Einfluß der Beleuchtungsstärke.

Die Beleuchtungsstärken wurden durch Veränderung der Entfernung zwischen Lichtquelle und Assimilationsgefäß variiert, ihre relativen Größen nach dem Entfernungsgesetz berechnet Je größer die räumliche Ausdehnung der Lichtquelle und je geringer ihr Abstand vom Assimilationsgefäß, um so ungenauer wird die Berechnung, doch betrugen nach Bestimmungen, die mit meiner Versuchslampe in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt ausgeführt wurden[2], die Fehler nicht mehr als 3%, wenn die Lampe dem Assimilationsgefäß bis auf 20 cm genähert wurde.

Die Suspensionsflüssigkeit war das Carbonatgemisch 9 (Tabelle 1), die Konzentration der Kohlensäure somit $91 \cdot 10^{-6}$ oder so hoch, daß kleine Änderungen der Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich beeinflußten

Die Versuche werden um so reiner, je weniger das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß geschwächt wird Ich arbeitete deshalb mit möglichst dünnen Zellsuspensionen, die von dem auffallenden Licht nur 10—20% absorbierten[3]

[1] KREUSLER: Landwirtschaftl Jahrb 14, 913. 1885 — BROWN u. ESCOMBE: Proc of the roy soc of London 70, 397. 1902. — BLACKMAN u SMITH Proc of the roy soc of London B. 83, 389. 1911

[2] Herrn Geheimrat LIEBENTHAL von der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt spreche ich auch hier für die Ausführung der Bestimmungen meinen herzlichen Dank aus

[3] Die Größe der Absorption läßt sich in einfacher Weise bestimmen, indem man bei tiefen Lichtstärken die Assimilationsleistung für verschieden dichte Zellsuspensionen mißt Die Zelle dient hierbei selbst als Photometer.

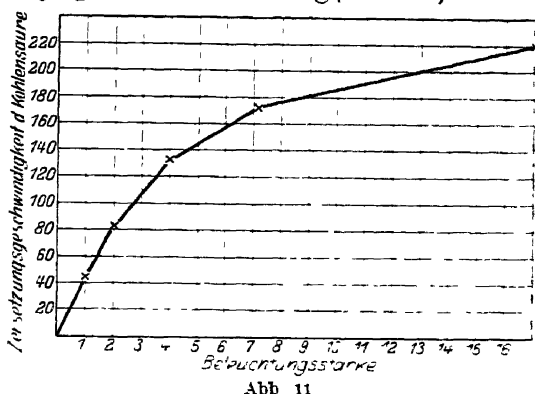
Tabelle 3.

$C_{CO_2} = 91 \cdot 10^{-6}$. 25°. 1 mm = 0.67 cmm CO_2.

Stromverbrauch der Lampe bei normaler Belastung Watt	Abstand der Lampe vom Assimilationsgefäß cm	Relative Beleuchtungsstärke	Dauer des Versuches Min	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Assimilation in mm pro Stunde
300	80	1	60	45	45
300	56,5	2	30	41	82
300	40	4	20	45	135
300	30	7,1	15	43	172
300	20	16	15	55	220
1500	20	ca. 45	15	60	(240)

Zur Messung wurde je 10 ccm Zellsuspension in ein Assimilationsgefäß pipettiert und weiterhin nach Anordnung III verfahren. Ein Beispiel ist in Tabelle 3 und der graphischen Darstellung (Abb 11) wiedergegeben. Die Geschwindigkeit für die höchste Beleuchtungsstärke, deren relative Größe nur ungenau definiert ist, wurde in die graphische Darstellung nicht aufgenommen und ist in der Tabelle eingeklammert

Abb 11

Aus den Zahlen geht hervor, daß bei niedrigen Beleuchtungsstärken die Assimilationsgeschwindigkeit annähernd proportional der Beleuchtungsstärke ist, ein Resultat, das im Einklang mit allen früheren Beobachtungen steht[1], bei höheren Beleuchtungsstärken entspricht einem bestimmten Zuwachs der Beleuchtungsstärke ein stetig kleiner werdender Zuwachs der Assimilationsgeschwindigkeit ein Verhalten das mit WILLSTAETTERS[2] Beobachtungen an den gelben Blättern der Ulme und des Hollunders übereinstimmt

Das Bild der Kurve Abb 11 ist ähnlich der Kurve Abb 10, die den Einfluß verschiedener Kohlensäurekonzentrationen bei konstanter Beleuchtungsstärke veranschaulicht, die „Konzentration der Lichtenergie" wirkt hier wie die Konzentration eines chemischen Stoffes Diese Übereinstimmung legt die Vermutung nahe, daß jeder Beleuch-

---

[1] PFEFFER· Pflanzenphysiologie 1, 324 1897 — BROWN u ESCOMBE Proc of the roy soc. of London B. 76, 29 1905 — BLACKMAN u MATTHAEI, Proc. of the roy soc of London B. 76, 402 1905 — BLACKMAN u SMITH: Proc of the roy soc of London B. 83, 389 1911.

[2] l c. S 149.

tungsstärke eine ihr bestimmte Konzentration an photochemischem Primärprodukt entspricht, das nach Maßgabe seiner Konzentration in einer chemischen Reaktion wirksam wurde.

Die Form der Kurve Abb. 11 würde dann ebenso wie die Form der Kurve Abb. 10 zu erklären sein, indem wir die Assimilationsgeschwindigkeit proportional der Konzentration des photochemischen Primärproduktes und der Konzentration eines zweiten Stoffes setzten, mit dem das photochemische Primärprodukt reagierte.

V. Einfluß der Temperatur.

Der Belichtungsthermostat war auf Temperaturen zwischen 5 und 32° eingestellt. Die Assimilationsgefäße wurden nach Einbringen in den Belichtungsthermostaten vor Entzündung der Lichtquelle 15 Minuten vorgewärmt oder vorgekühlt. Selbst bei den höchsten Beleuchtungsstärken stieg die Temperatur der Zellensuspensionen nie höher als $^1/_{10}$° über die Temperatur des Thermostatenwassers. Eine Schwierigkeit, die in Versuchen mit Blättern nie ganz überwunden wurde, die genaue Bestimmung der Temperatur der assimilierenden Zelle, fiel also in unsrer Anordnung fort.

Die Suspensionsflüssigkeiten waren Carbonatgemische oder bei 25° mit 4 Volumprozent Kohlensäure gesättigte Knopsche Lösung; in beiden Flüssigkeiten ändert sich die Konzentration der Kohlensäure mit der Temperatur, im ersten Fall steigt sie, im zweiten Fall sinkt sie, wenn die Temperatur steigt. Bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen müssen diese Änderungen berücksichtigt und die beobachteten Assimilationswerte auf gleiche Kohlensäurekonzentrationen umgerechnet werden. Bei Kohlensäurekonzentrationen von über 1000×10^{-6} sind Korrektionen nicht erforderlich.

Da sich der Temperatureinfluß mit der Temperatur stark ändert, ist es nicht korrekt, Temperaturkoeffizienten für 10° anzugeben. Um jedoch den Vergleich mit früheren Versuchen zu erleichtern, habe ich die Temperaturkoeffizienten in der üblichen Weise für 10° berechnet; sie sind im letzten Stab der Tabelle 5, in der einige Versuchsresultate zusammengestellt sind, beigefügt.

Betrachten wir zunächst das Verhalten bei hohen Kohlensäurekonzentrationen und Beleuchtungsstärken (Versuch 3, 4 und 5 der Tabelle), so ergibt sich, daß sich der Temperatureinfluß mit der Temperatur sehr stark ändert: in dem Gebiet zwischen 5° und 32° sinkt der Temperaturkoeffizient von 4,3 auf 1,6. Die Assimilation verhält sich in dieser Beziehung ganz ähnlich wie die Atmung, deren Koeffizient in Versuchen an roten Blutzellen zwischen 0° und 38° von 5 auf 2,4

Tabelle 4.

Nr des Versuchs	Milieu	Temperatur °C	C_{CO_2} in Molen pro Liter	Beleuchtungsstärken[1]	Beobachtete Druckdifferenz Hell-Dunkel	Meßtemperatur °C	Assimilation in mm pro Std	Auf gleiche CO_2-Konzentrationen korrigiert	Temperaturkoeffizient für 10°
1	Carbonatgemisch 1	5	$0{,}41 \times 10^{-6}$	16	+ 15 in 120′	10	7,5	8,1	4,7
		10	$0{,}44 \times 10^{-6}$		+ 35 in 120′	10	17,5	17,5	
	Carbonatgemisch 2	5	$0{,}78 \times 10^{-6}$		+ 25 in 120′	10	12,5	13,2	5,0
		10	$0{,}83 \times 10^{-6}$		+ 59 in 120′	10	29,5	29,5	
	Carbonatgemisch 9	5	71×10^{-6}		+ 20 in 20′	10	60	61	4,7
		10	76×10^{-6}		+ 44 in 20′	10	132	132	
2	Carbonatgemisch 9	16	80×10^{-6}	16	+ 135 in 60′	25	135	139	2,0
		25	91×10^{-6}		+ 127 in 30′	25	254	254	
3	Knopsche Lösung	5,4	mehr als 1000×10^{-6}	45	+ 29 in 30′	25	58		4,3
		5,4	1000×10^{-6}		+ 29 in 30′	25	58		
		10	1000×10^{-6}		+ 57 in 30′	25	114		
		10	1000×10^{-6}		+ 61 in 30′	25	122		
4	Knopsche Lösung	10	1000×10^{-6}	45	+ 42 in 30′	25	84		2,1
		20	1000×10^{-6}		+ 45 in 15′	25	180		
		20	1000×10^{-6}		+ 46 in 15′	25	184		
5	Knopsche Lösung	20	1000×10^{-6}	45	+ 56 in 15′	25	224		1,6
		30	1000×10^{-6}		+ 88 in 15′	25	352		
6	Knopsche Lösung	15	1000×10^{-6}	1,8	+ 62 in 30′	25	124		1,06
		25	1000×10^{-6}		+ 66 in 30′	25	132		
7	Carbonatgemisch 9	25	91×10^{-6}	1	+ 50 in 15	25	200	203	1
		32	99×10^{-6}		+ 52 in 15	25	204	204	

sank[2]. Für die Assimilation in Blättern wurde bisher eine derartig starke Änderung der Koeffizienten mit der Temperatur nicht beobachtet. Blackman[3] berechnete einen konstanten Wert von etwa 2 für den gesamten Temperaturbereich der Assimilation, während nach Kanitz[4] der Koeffizient zwischen 0° und 37° von 2,4 auf 1,8 fällt. Da jedoch in den Versuchen, auf denen diese Berechnungen beruhen, die Zustände vielfach nicht stationär waren, sondern Zeitfaktoren eine Rolle spielten, ferner die schon erwähnte Schwierigkeit einer genauen Temperaturbestimmung bestand, so ist die Differenz der Werte für Blätter und unsere Grünalge nicht allzu auffallend[5].

Versuch 6 u. 7 bestätigen die wichtige Entdeckung Blackmans[6], daß sich der Koeffizient bei niedrigen Beleuchtungsstärken dem Wert von 1 nähert.

---

[1] In den Einheiten der Tabelle 3.
[2] Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. **14**, 310. 1914.
[3] Annales of Botany **19**, 281. 1905.
[4] Temperatur u. Lebensvorgänge, Berlin 1915, S. 18.
[5] Vgl. von Willstaetter, l. c. S. 152ff.
[6] Annales of Botany **19**, 281. 1905.

Versuch 1 zeigt, daß der Koeffizient bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen 4 bis 5 beträgt, also etwa ebenso hoch ist, wie bei hohen Kohlensäurekonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen.

VI. Einfluß intermittierender Beleuchtung.

Zur Unterbrechung der Lichtzufuhr dienten die beschriebenen Sektorscheiben (Abb. 8), die während einer Umdrehung die Hälfte des Lichts abschnitten, so daß die Belichtungszeiten gleich der Hälfte der Versuchszeiten waren. Die Dauer einer Belichtungsperiode war gleich der Dauer einer Dunkelperiode und verschieden, je nach der Rotationsgeschwindigkeit der Scheiben und der Zahl ihrer Ausschnitte.

Die Zellen wurden in dem Carbonatgemisch 9 oder in KNOPscher Lösung suspendiert, im letzteren Fall unter Sättigung mit 4 Volumprozent Kohlensäure. Die Kohlensäurekonzentrationen waren demnach so hoch, daß erhebliche Konzentrationsänderungen die Assimilationsleistungen nicht beeinflußten.

Bei der „hohen Beleuchtungsstärke" blieb die Assimilationsleistung unverändert, wenn das Licht mittels eines Rauchglases auf die Hälfte geschwächt wurde; bei der „niedrigen Beleuchtungsstärke" hatte die gleiche Schwächung eine Verminderung der Assimilationsleistung auf etwa die Hälfte zur Folge.

Die Wirkungen intermittierender und kontinuierlicher Beleuchtung wurden verglichen, indem die Assimilationsleistungen nicht auf gleiche Versuchszeiten, sondern auf gleiche Belichtungszeiten bezogen wurden. Die Differenz der Werte für gleiche Belichtungszeiten ist in den Tabellen 5 bis 8, in denen einige Messungsergebnisse zusammengestellt sind, als

Tabelle 5

1 mm = 0,67 cmm CO_2

25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 2teilige Sektorscheibe $C_{CO_2} = 91 \cdot 10^{-6}$.

Versuchszeit Min.	Belichtungszeit Min.	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei intermittierender Beleuchtung in %
15	15	0 (kontin.)		− 31	
30	15	2	15	− 37	14
15	15	0 (kontin.)		− 34	
30	15	20	1,5	− 45	36
15	15	0 (kontin.)		− 32	
30	15	200	0,15	− 50	56
30	15	2000	0,015	− 55	72
15	15	0 (kontin.)		− 32	

„Mehrleistung des Lichts" bezeichnet. Sämtliche Messungen, im ganzen über 200, wurden nach Anordnung III ausgeführt

Tabelle 6.

1 mm = 0,67 cmm CO_2.

25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 8teilige Sektorscheibe. $C_{CO_2} = 91 \cdot 10^{-6}$

Versuchszeit Min.	Belichtungszeit Min	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek.	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei intermittierender Beleuchtung in %
15	15	0 (kontin.)		− 49	
30	15	2000	0,0038	− 94	96
30	15	200	0,038	− 85	77
15	15	0 (kontin.)		− 46	
30	15	20	0,38	− 70	46

Tabelle 7.

1 mm = 1,04 cmm CO_2

25°. Hohe Beleuchtungsstärke. 8teilige Sektorscheibe $C_{CO_2} = 1360 \cdot 10^{-6}$

Versuchszeit Min	Belichtungszeit Min	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei intermittierender Beleuchtung in %
15	15	0 (kontin.)		− 30	
30	15	2000	0,0038	60	88
15	15	0 (kontin.)		33	

Tabelle 8

1 mm = 0,67 cmm CO_2

25° Niedrige Beleuchtungsstärke 8teilige Sektorscheibe $C_{CO_2} = 91 \cdot 10^{-6}$

Versuchszeit Min	Belichtungszeit Min	Tourenzahl des Sektors pro Minute	Dauer einer Periode in Sek	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Mehrleistung des Lichts bei intermittierender Beleuchtung in %
30	15	2000	0,0038	− 42	—
15	15	0 (kontin.)		− 45	
15	15	0 (kontin.)		− 45	—
30	15	2000	0,0038	− 43	

Das Ergebnis der Versuche läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Bei hoher Intensität der Strahlung zersetzte eine bestimmte Energiemenge mehr Kohlensäure, wenn sie intermittierend, als wenn sie kontinuierlich auffiel. Die Mehrleistung hing ab von der Schnelligkeit, mit der Hell- und Dunkelperioden wechselten. sie betrug fast 100% bei einer Wechselzahl von 8000 pro Minute und etwa 10% bei einer Wechselzahl von 4 pro Minute.

Bei niedriger Intensität der Strahlung zersetzte eine bestimmte Energiemenge ebensoviel Kohlensäure, wenn sie intermittierend, als wenn sie kontinuierlich auffiel.

Sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Intensitäten kontinuierlich auffallender Strahlung geht nur ein Bruchteil der absorbierten Energie in chemische Energie über, so daß der erste Fall nicht in Widerspruch zu dem ersten Energiesatz steht, der zweite Fall nach demselben Satz nicht vorauszusehen ist.

Der zweite Fall entspricht dem des menschlichen Auges, in dem eine bestimmte Energiemenge die gleichen chemischen Wirkungen hervorbringt, ob sie intermittierend oder kontinuierlich auffällt.

Leistet eine bestimmte Energiemenge, die im Wechsel mit gleichlangen Dunkelperioden auffällt, 100% mehr als bei kontinuierlicher Einwirkung, so können wir auch sagen: in einem Zeitabschnitt, der groß gegen die Dauer einer Periode ist, werden bei intermittierender und bei kontinuierlicher Beleuchtung gleiche Kohlensäuremengen zersetzt, oder die durchschnittlichen Assimilationsgeschwindigkeiten sind bei beiden Beleuchtungsarten gleich. Zur Erklärung gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder die Zersetzung geht in den Dunkelperioden mit unveränderter Geschwindigkeit weiter — wobei an eine Art Energiespeicherung zu denken wäre — oder die Zersetzung ist in den Dunkelperioden unterbrochen, in den Hellperioden verdoppelt. Den letzteren Fall halten wir zunächst für den wahrscheinlicheren und nehmen an, daß bei Unterbrechung der Lichtzufuhr Teilreaktionen des Assimilationsmechanismus noch eine kurze Zeit, bis zur Einstellung eines Dunkelgleichgewichts, weitergehen. Nach einer Dunkelperiode würde dann das Licht auf höhere Konzentrationen an zersetzlicher Substanz treffen und deshalb mehr leisten, als bei kontinuierlicher Einwirkung. Licht niedriger Intensität würde nach einer Dunkelperiode nicht mehr leisten, weil in der Hellperiode das Dunkelgleichgewicht praktisch nicht verschoben würde, mithin die Konzentration an zersetzlicher Substanz während der Verdunkelung nicht zunehmen könnte. Auf die Prüfung dieser Theorie, nach der sich mittels der Sektormethode die Zeitgesetze der verschiedenen Dunkelvorgänge ermitteln lassen mußten, soll erst in einer späteren Mitteilung eingegangen werden.

Die Versuche mit intermittierender Beleuchtung wurden durch eine Bemerkung von BROWN und ESCOMBE[1] angeregt, nach der sie sich in ihren Assimilationsversuchen zur Schwachung des Lichts vielfach der Methode der rotierenden Sektoren bedienten. Wurde zwischen ein stark beleuchtetes Blatt und die Lichtquelle ein rotierender Sektor eingeschaltet, so konnte $^3/_4$ des Lichts fortgenommen werden, „bevor irgendeine merkbare Verminderung der assimilatorischen Leistung des Blattes nachzuweisen war". WILLSTAETTER[2] nimmt an, daß hier bei dem niedrigen Kohlensauregehalt der umgebenden Luft die verkurzte Belichtungszeit schon genügte, „um die in den kurzen Verdunkelungsintervallen zu den Chloroplasten gelangende Kohlensaure vollstandig zu reduzieren".

Haben BROWN und ESCOMBE das Licht nicht nur geschwacht, sondern, was sich aus ihren Angaben nicht ersehen laßt, die assimilierende Zelle periodenweise verdunkelt, so ist der erwahnte Versuch wahrscheinlich nach WILLSTAETTER zu erklaren. Auch in diesem Falle würde wahrend der Verdunkelungperioden ein Teilvorgang der Assimilation weitergehen, jedoch keine chemische Reaktion, wie in unserem Fall, sondern die Diffusion der Kohlensaure

VII. Einfluß permeierender Substanzen.

Der grundlegende Versuch uber die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation stammt von CLAUDE BERNARD[3] Mittels kleiner Dosen Chloroform konnte die Assimilation reversibel gehemmt werden, ohne daß gleichzeitig die Oxydationsgeschwindigkeit sank „On pourrait donc, a l'aide des anesthésiques, séparer la fonction chlorophyllienne de la respiration" Diese Beobachtung wurde in der Folgezeit vielfach bestatigt[4], in BLACKMANS Laboratorium dahin erweitert[5], daß Chloroformkonzentrationen, die die Assimilation hemmen die Atmung sehr erheblich beschleunigen

In Übereinstimmung mit diesen Erfahrungen ließ sich die Assimilation in der grunen Alge durch Narkotica der verschiedensten Klassen reversibel hemmen, die Atmung recht erheblich — und zwar gleichfalls reversibel — beschleunigen Sieht man ab von den leicht fluchtigen, bei hoheren Konzentrationen cytolytisch wirkenden Narkotica, so konnte

[1] Proc. of the roy soc of London B 76, 29 1905
[2] l c. S. 240
[3] Leçons sur les Phénomènes de la Vie, 1, 278 bis 279 Paris 1885
[4] Z. B.: BONNIER u. MANGIN, Compt rend. 101, 1303. 1885
[5] IRVING Annals of Botany 25, 1077 1911 — THODAY Annals of Botany 27, 97 1913.

die Atmung, wie in früheren Versuchen an nichtgrünen Zellen[1], auch reversibel gehemmt werden.

Wir haben hiernach drei verschiedene Wirkungen der Narkotica zu unterscheiden die Assimilationshemmung, die Atmungsbeschleunigung und die Atmungshemmung Die Konzentrationen, bei denen diese Wirkungen eintraten, sind in Tabelle 9 fur Phenylurethan zu-

Tabelle 9. *Phenylurethan*

Gewichts-prozente	Wirkung auf die Assimilation der Alge	Wirkung auf die Atmung der Alge	Wirkung auf andere Lebensvorgänge
0,1	vollig gehemmt	ca 50% gehemmt	Hemmung der Garung in lebender Hefe um ca. 50%
0,05	vollig gehemmt	unverandert	Hemmung der Atmung in nichtgrunen Zellen um ca 50%
0,025	fast vollig gehemmt	stark beschleunigt	
0,013	sehr stark gehemmt	,,	Grenzkonzentration fur die Gehirnnarkose der Kaulquappen[2]
0,0076	ca 50% gehemmt	,,	
0,005	ca. 30% gehemmt	beschleunigt	
0,002	Grenzgebiet	,,	
0,001		Grenzgebiet	

sammengestellt und mit den in anderen Fallen wirksamen Konzentrationen desselben Narkoticums verglichen

Aus der Tabelle ergibt sich, daß die Konzentrationen, durch die die Assimilation in der Alge eben nachweisbar gehemmt, die Atmung eben nachweisbar beschleunigt wird, nahe zusammenliegen und etwa 20mal so niedrig sind, wie die atmungshemmende Konzentration Ein Vergleich mit den in anderen Fallen wirksamen Konzentrationen zeigt, daß die Assimilation schon bei Konzentrationen gehemmt wird, bei denen noch keine Wirkung auf die Gehirnganglien von Kaltblütern nachweisbar ist Ordnet man die Lebensvorgange nach ihrer Empfindlichkeit gegenuber hemmend wirkenden narkotischen Substanzen in eine Reihe, so steht die Assimilation an erster Stelle Berucksichtigen wir, daß die Wirkung der Narkotica auf einer Veranderung der Grenzschichten beruht, so hebt also die geringfugigste Veranderung der Grenzschichten

[1] Asher-Spiro· Ergebnisse der Physiologie 14, 253 1914
[2] Overton Studien uber die Narkose, Jena 1901, 112.

das Assimilationsvermögen auf. Hierzu stimmt die Erfahrung, daß die Assimilation im Gegensatz zu anderen Zellvorgängen, wie Atmung und Gärung, schon durch die geringfügigsten mechanischen Eingriffe in die Zellstruktur sistiert wird.

Von Substanzen, die nicht in die Klasse der Narkotica gehören, wurde besonders die Blausäure geprüft. In früheren Versuchen an tierischen und pflanzlichen Zellen hemmte Blausäure die Oxydationsgeschwindigkeit bei Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-5} Molen pro Liter. Durch etwa die gleichen Konzentrationen ließ sich die Assimilation der grünen Alge — und zwar reversibel — hemmen; hierbei waren die Oxydationen jedoch nicht gehemmt, sondern beschleunigt. Noch eine $^n/_{100}$-Blausäurelösung — d. h. das 100fache der assimilationshemmenden Konzentration — beschleunigte die Oxydationen erheblich. Die Assimilation in der grünen Zelle verhält sich also gegenüber Blausäure wie die Atmung in nichtgrünen Zellen, während die Atmung der grünen Zelle völlig atypisch reagiert. Hierfür fehlt zunächst jede Erklärung.

Wird die Assimilationsgeschwindigkeit unter verschiedenen äußeren Bedingungen durch verschiedene Teilvorgänge bestimmt, so ist zu erwarten, daß sich die Wirkung eines Stoffes mit den äußeren Bedingungen ändern wird. In der Tat war eine Blausäurekonzentration, die die Assimilation bei hohen Beleuchtungsstärken um 50% hemmte, bei niedrigen Beleuchtungsstärken fast wirkungslos. Phenylurethan in mittleren Konzentrationen hemmte sowohl bei hoher als auch bei niedriger Intensität der Beleuchtung und zwar in letzterem Fall etwas stärker. Der bei hohen Beleuchtungsstärken maßgebende Vorgang ist also empfindlich, der bei niedrigen Beleuchtungsstärken maßgebende Vorgang unempfindlich gegen Blausäure, beide Vorgänge sind empfindlich gegen Phenylurethan. Die Empfindlichkeit des bei niedrigen Beleuchtungsstärken maßgebenden Vorganges gegen oberflächenaktive Stoffe ist von besonderem Interesse und zeigt, daß hier neben der Lichtabsorption, die durch Phenylurethan ja nicht gehemmt wird, eine oberflächenempfindliche Dunkelreaktion eine Rolle spielt (vgl. hierzu Abschnitt IV).

Versuche mit Blausäure.

Die Blausäurelösungen wurden hergestellt entweder durch Zugabe von freier Blausäure zu Knopscher Lösung oder durch Zugabe von Kaliumcyanid zu Carbonatgemischen. Im zweiten Fall berechnete sich die Konzentration an freier Blausäure aus der Wasserstoffionenkonzentration der Carbonatgemische und der Dissoziationskonstante der Blausäure, sofern die zugesetzten Cyanidmengen im Vergleich zu den Carbonatmengen klein waren. Bezeichnen wir mit C die Gesamtkonzentration an Cyanid, mit H^+ die Wasserstoffionenkonzentration

der Carbonatgemische, mit K die Dissoziationskonstante der Blausäure, so ist die Konzentration der freien Blausäure

$$x = \frac{C \times H^+}{H^+ + K}$$

Für das meistbenutzte Carbonatgemisch 9 (Tabelle 1) wurde H^+ nach SOERENSENS colorimetrischer Methode[1] bei $25^0 = 10^{-9,36}$ gefunden, bei der gleichen Temperatur ist $K^{2*} = 7,2 \times 10^{-10}$, somit x

$$x = \frac{C}{2,65}$$

Zum Versuch wurden gleiche Zellmengen zu gleichen Mengen blausäurehaltiger und blausäurefreier Flüssigkeit gegeben und 2 Assimilationsgefäße mit je 10 ccm blausäurehaltiger, 2 Assimilationsgefäße mit je 10 ccm blausäurefreier Zellsuspension beschickt. Von den 4 Gefäßen wurden 2 auf der Drehscheibe symmetrisch zur Lichtquelle befestigt und belichtet, 2 dienten als Dunkelkontrollen und wurden während der Belichtung auf der gleichen Scheibe in Metallhülsen gedreht.

Die Kohlensäurekonzentrationen waren so hoch, daß erhebliche Änderungen die Assimilationsgeschwindigkeit nicht merklich beeinflußten, die Beleuchtungsstärken entweder gleichfalls sehr hoch (Stärke 16 bis 45) oder so niedrig (Stärke 1), daß bei einer Schwächung des Lichts auf die Hälfte die Assimilationsgeschwindigkeit auf die Hälfte sank.

Aus Tabelle 10, in der einige Messungsergebnisse zusammengestellt sind, geht hervor, daß eine Blausäurekonzentration von $3,8 \times 10^{-5}$

Tabelle 10

25^0. $c_{CO_2} = 91 \times 10^{-6}$. a = Carbonatgemisch, b = Carbonatgemisch + $3,8 \times 10^{-5}$ Mole freie HCN pro Liter. 1 mm = 0,7 cmm O_2.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer	Beleuchtungsstärke	Druckdifferenz bei Belichtung		Druckänderung im Dunkeln		Assimilation in mm pro Stunde		Atmung in mm pro Stunde		Assimilationshemmung	Atmungsbeschleunigung
	Min		in b	in a	in b	in a	in b	in a	in b	in a		
1	30	0			— 22	— 14			44	28		57%
	10	ca. 45	— 45	+ 86			270	516			48%	
	60	1	— 81	+ 82			81	82			1%	
	30	0			— 17	— 12			34	24		42%
2	30	0			— 16	— 12			32	24		33%
	15	ca. 45	— 66	— 113			254	452			44%	
	30	1,5	— 39	— 42			78	84			7%	
	30	0			— 13	— 11			26	22		20%

[1] Ergebnisse der Physiol. 12, 393. 1912.

[2*] LANDOLT-BÖRNSTEIN. Tabellen, 1912. 1138.

Molen pro Liter die Assimilation bei hohen Beleuchtungsstärken um 40 bis 50%, bei niedrigen Beleuchtungsstärken nur um wenige Prozente hemmte, während gleichzeitig die Atmung stark beschleunigt war.

Wie sich die Atmung bei höheren Blausäurekonzentrationen verhält, zeigt die folgende Zusammenstellung

25°

c_{HCN} in Molen pro Liter	Beobachtete Druckänderung im Dunkeln in 60 Min.	Wirkung
0	— 59	
10^{-3}	— 77	31% Beschleunigung
10^{-2}	— 70	18% ,,
10^{-1}	— 36	40% Hemmung

Hierbei war die Suspensionsflüssigkeit KNOPsche Lösung, die frisch bereitete Blausäurelösung vor Herstellung der Verdünnungen mit Silbernitrat titriert. Aus den Zahlen ergibt sich, daß, bei Versuchszeiten von 60 Minuten, erst eine n/10-Blausäurelösung die Sauerstoffaufnahme merklich verminderte, während niedrigere Blausäurekonzentrationen die Oxydationen beschleunigten.

Versuche mit Phenylurethan.

Die Anordnung entsprach den Blausäureversuchen. Das Phenylurethan wurde in KNOPscher Flüssigkeit gelöst, die Zellsuspension bei 25° mit 4 Volumprozent Kohlensäure gesättigt.

Sollte auf Reversibilität einer Hemmung geprüft werden, so wurde nach Messung der Hemmung der Inhalt der 4 Assimilationsgefäße getrennt in 4 Zentrifugiergläser übergeführt, auf der Zentrifuge mehrmals mit reiner KNOPscher Lösung gewaschen, nach dem letzten Zentrifugieren auf das Anfangsvolumen aufgefüllt und die Assimilation erneut gemessen.

Aus Tabelle 11, in der einige Resultate zusammengestellt sind, ergibt sich, daß eine Phenylurethankonzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ Molen pro Liter die Assimilation bei hoher Beleuchtungsintensität um 40 bis 50%, bei niedriger Beleuchtungsintensität gleichfalls erheblich — und zwar eher stärker als schwächer — hemmte. Durch die gleiche Konzentration wurde die Atmung um 100 bis 240% beschleunigt. Sowohl die Assimilationshemmung als auch die Atmungsbeschleunigung waren reversibel. Wurde die Assimilationshemmung mit wachsenden Beleuchtungsstärken geringer, so entsprach einem bestimmten Anstieg der Beleuchtungsstärke ein mehr als proportionales Anwachsen der Assimilationsleistung, beispielsweise in Versuch 3 einer Verdoppelung der Beleuchtungsstärke fast eine Verdreifachung der Assimilationsleistung.

Tabelle 11.

25° $c_{CO_2} = 1360 \times 10^{-6}$. Knopsche Lösung = a. Knopsche Lösung + $4{,}6 \times 10^{-4}$ Mole Phenylurethan pro Liter = b. 1 mm = 1,04 cmm O_2.

Nr. des Versuchs	Versuchsdauer Min.	Beleuchtungsstärke	Druckdifferenz bei Belichtung		Druckänderung im Dunkeln		Assimilation in mm pro Stunde		Atmung in mm pro Stunde		Assimilationshemmung	Atmungsbeschleunigung
1	30	1	in b −6	in a −25			in b 12	in a 50			76%	
	30	0			in b −19	in a −8			in b 38	in a 16		140%
	10	16	−27	−48			162	288			44%	
	30	1	aus b in a −23	aus a in a −23			aus b in a 46	aus a in a 46			—	
2	30	2	in b −35	in a +67			in b 70	in a 134			50%	
	30	0			in b −36	in a −18			in b 72	in a 36		100%
	30	2	aus b in a −66	aus a in a +69			aus b in a 132	aus a in a 138			4%	
	30	0			aus b in a −14	aus a in a −15			aus b in a 28	aus a in a 30		—
	10	ca 45	+100	+102			600	612			2%	—
3	30	1	in b +9	in a +23			in b 18	in a 46			61%	
	30	2	−25	−46			50	92			46%	
	30	0			in b −20	in a −6			in b 40	in a 12		234%
	10	16	−28	−49			168	294			43%	

Biochem Zeitschr **103**, 188 1920

Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. II.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 6 Januar 1920)

Mit 3 Abbildungen.

Die vorliegende Mitteilung[1] zerfallt in folgende Abschnitte:

I Photochemische Induktion bei der Assimilation Intermittierende Bestrahlung bei langer Dauer der Perioden. Einfluß der Intensitat der Bestrahlung Anwachsen der Assimilationsgeschwindigkeit nach langen Dunkelperioden

II. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Assimilation

III Die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation Abhangigkeit der Wirkung von der Narkoticumkonzentration Änderung der Wirkungsstarke innerhalb einer homologen Reihe Wirkung bei tiefen CO_2-Konzentrationen

IV Die Wirkung der Blausaure auf die Assimilation

V. Die assimilierende Zelle als Photolyt Physikalisch-chemische Vorbemerkung Kinetik der Assimilation Der Primarvorgang Die Acceptorbildung Sekundarreaktion und Acceptorbildung

VI Reduktion der Salpetersaure in der lebenden Zelle

I Photochemische Induktion

Bestrahlt man ein Gemisch von Chlor und Wasserstoff so bildet sich anfangs nur wenig Salzsaure, und erst allmahlich steigt die Geschwindigkeit der Salzsaurebildung zu einem konstanten Endwert an. Eine derartige Erscheinung, die vielfach bei photochemischen Vorgangen beobachtet wird, nannten Bunsen und Roscoe „photochemische Induktion“; sie beruht, wie wir heute wissen, nicht auf einer Besonderheit des photochemischen Primarvorganges, sondern auf sekundaren

[1] Fortsetzung von dieser Zeitschr. **100**, 230. 1919

Reaktionen[1], im Fall der Chlorwasserstoffbildung auf der Reaktion der bei Bestrahlung primär[2] gebildeten freien Chloratome mit Verunreinigungen des Chlorknallgases.

Bei Fortsetzung der Assimilationsversuche mit intermittierender Bestrahlung zeigte es sich, daß die Erscheinung der photochemischen Induktion auch bei der Assimilation beobachtet wird. Geht man nämlich zu langen Perioden über und vergrößert außerdem die Dunkelperioden im Vergleich zu den Hellperioden, so zersetzt eine bestimmte Menge Strahlung, die im Wechsel mit Dunkelperioden einwirkt, weniger Kohlensäure als bei kontinuierlicher Bestrahlung.

Die Versuche wurden in Carbonatgemischen von 85 Teilen $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^m/_{10}$-Na_2CO_3 angestellt. Die Kohlensäurekonzentration war somit bei 25° $91 \cdot 10^{-6}$ oder so hoch, daß eine Verdopplung die Assimilationsgeschwindigkeit nur unerheblich steigerte. „Hohe" Bestrahlungsintensität war eine solche von 10000 bis 20000 Lux[3], bei der die Assimilation nahezu ihren Maximalwert erreicht hat und etwa das 20fache der Atmung beträgt; „tiefe" Bestrahlungsintensität war eine solche von 400 bis 800 Lux, bei der die Assimilation etwa gleich der Atmung ist. Bei den Versuchen mit hoher Bestrahlungsintensität waren die Zellsuspensionen so dünn, daß das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß nur um etwa 10% geschwächt wurde.

In Tabelle 1 ist ein Versuch wiedergegeben, in dem die Dauer der Hellperioden gleich war, und zwar stets gleich einer Minute, während

Tabelle 1.
25°. Hohe Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff

Gesamtbelichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
10	kontinuierlich	+ 40	
10	1′ dunkel 1′ hell	+ 36	10
10	2′ dunkel 1′ hell	+ 26	35
10	3′ dunkel 1′ hell	+ 18	55
10	4′ dunkel 1′ hell	+ 14	65

[1] Burgess u. Chapman: Journ. of the chem. soc. (London) 89, 1319. 1906. — Luther u. Goldberg: Zeitschr. f. physikal. Chem. 56, 43. 1906.

[2] Nernst: Zeitschr. f. Elektrochem. 1918, 335.

[3] Eine Bestrahlungsintensität, bei der die Zellen gezüchtet werden können.

Tabelle 2.

25°. Hohe Bestrahlungsintensität. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff

Nr. des Versuchs	Gesamtbelichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
1	10	kontinuierlich	— 45	
	10	5′ dunkel / 1′ hell	— 12	73
2	10	kontinuierlich	— 45	
	10	5′ dunkel / 1′ hell	— 13	71
3	10	kontinuierlich	+ 20	
	10	5′ dunkel / 1′ hell	— 5	75
8	10	kontinuierlich	+ 27	
	10	5′ dunkel / 1′ hell	— 4	85
5	10	kontinuierlich	— 26	
	10	5′ dunkel / 1′ hell	+ 6	77

die Dauer der Dunkelperioden zwischen einer und vier Minuten variiert wurde. Der Versuch begann nach vorheriger halbstündiger kontinuierlicher Bestrahlung.

Tabelle 2 enthält 5 Versuche, in denen auf eine Dunkelperiode von 5 Minuten eine Hellperiode von 1 Minute folgte.

Aus beiden Tabellen ergibt sich, daß eine bestimmte Menge Strahlung nach langen Dunkelperioden weniger leistet als bei kontinuierlicher Einwirkung. Diese Wenigerleistung ist bei der Folge von einer Hellminute und einer Dunkelminute unerheblich, sie beträgt bei einer Verlängerung der Dunkelperioden auf 5 Minuten 70 bis 80% der Leistung bei kontinuierlicher Bestrahlung. Eine Verlängerung der Dunkelperioden über 5 Minuten hinaus hatte, unter sonst gleichen Bedingungen, kein weiteres Herabgehen der Leistung zur Folge.

Die Geschwindigkeit der Assimilation steigt also nach einer langen Dunkelperiode allmählich an. Will man diesen Anstieg direkt messen, so ist es methodisch nicht korrekt, die Druckänderungen am Manometer etwa von Minute zu Minute zu beobachten, da es einiger Zeit bedarf, bis der in der Zelle gebildete Sauerstoff an den Gasraum abgegeben wird. Die Anordnung war deshalb folgende: Nach einer Dunkelperiode von 5 Minuten wurde zunächst 0,5 Minuten bestrahlt, dann verdunkelt und erst nach einigen Dunkelminuten abgelesen, wenn die Druck-

differenz zwischen dem bestrahlten Gefäß und der nicht bestrahlten Kontrolle konstant geworden war. Der Versuch wurde mit Bestrahlungszeiten von 1,0, 1,5, 2,0 und 3,0 Minuten wiederholt, indem der Bestrahlung stets eine Dunkelperiode von 5 Minuten vorausging. Um nach so kurzen Bestrahlungszeiten schon gut meßbare Ausschläge zu erhalten, mußte mit ziemlich dichten Zellsuspensionen gearbeitet werden, die das Licht beim Durchgang durch das Assimilationsgefäß um etwa 75% schwächten. Man erhält so nicht die Kurve für die hohe Intensität der auffallenden Strahlung, sondern für eine mittlere Strahlungsintensität.

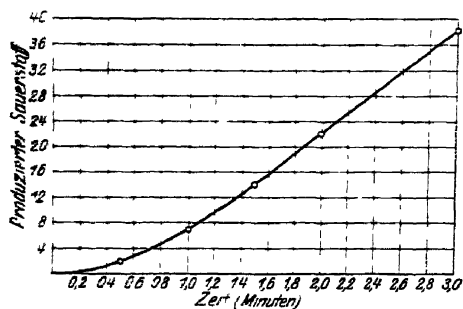



Abb. 1.

Eine Beobachtungsreihe ist in Tabelle 3 zahlenmäßig, in Abb. 1 graphisch wiedergegeben. Die zunächst kleine Assimilationsgeschwindigkeit erreicht also bei 25° nach etwa 2 Minuten einen konstanten Endwert.

Tabelle 3. 25°. *Hohe Intensität der auffallenden Strahlung.* 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Belichtungszeit in Minuten	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Sauerstoffproduktion, auf 30 Sek. berechnet
0,5	2	2
1,0	7	5
1,5	14	7
2,0	22	8
3,0	38	8

Hätte die Induktion bei der Assimilation ähnliche Ursachen wie bei der Chlorknallgasreaktion, so mußte die Induktionszeit um so kürzer sein, je höher die Bestrahlungsintensität. Tabelle 4, in der einige Versuche mit niedriger Bestrahlungsintensität wiedergegeben sind, zeigt, daß hier eine Induktion nicht nachzuweisen ist, indem bei intermittierender und kontinuierlicher Bestrahlung innerhalb der Fehlergrenzen gleiche Leistungen gefunden werden. Es geht daraus hervor, daß die Induktion bei der Assimilation in anderer Weise als bei der Chlorknallgasreaktion gedeutet werden muß.

Zusammenfassung.

Bestrahlt man eine vorher verdunkelte Zelle mit hoher Intensität, so steigt die Assimilationsgeschwindigkeit von einem niedrigen Anfangswert im Laufe einiger Minuten auf einen konstanten Endwert.

Tabelle 4. *25°. Niedrige Bestrahlungsintensität.*
1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Gesamt-belichtungszeit in Minuten	Belichtungsart	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Wenigerleistung des Lichts bei intermittierender Bestrahlung %
1	10	kontinuierlich	+ 12	—
	10	5′ dunkel 1′ hell	+ **11**	
2	10	kontinuierlich	+ 13	—
	10	3′ dunkel 1′ hell	+ **13**	
3	10	kontinuierlich	+ 14	—
	10	5′ dunkel 1′ hell	+ **15**	

Bestrahlt man eine vorher verdunkelte Zelle mit niedriger Intensität, so ist eine Induktionszeit nicht nachweisbar.

Verdunkelt man eine Zelle nach vorheriger intensiver Bestrahlung, so stellt sich allmählich der inaktive Zustand wieder ein, nach einer Verdunkelungszeit von einer Minute ist die Inaktivierung eben merklich, nach einer Verdunkelungszeit von 5 Minuten ist die Inaktivierung beendigt oder das „Dunkelgleichgewicht" erreicht

II Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Assimilationsgeschwindigkeit.

Bei niedrigen Sauerstoffdrucken verliert eine grüne Zelle die Fähigkeit, Kohlensäure photochemisch zu zersetzen der kritische Sauerstoffdruck liegt hierbei nach Beobachtungen WILLSTAETTERS[1] unter $1/_{1000}$ Atmosphäre

Abgesehen von dieser Hemmung ergab sich ein weiterer Einfluß des Sauerstoffdruckes, als die Assimilationsgeschwindigkeit bei Sauerstoffdrucken zwischen $1/_{50}$ und 1 Atmosphäre gemessen wurde, und zwar sank die Assimilationsgeschwindigkeit wenn der Sauerstoffdruck stieg

Die Versuche waren so angeordnet, daß die Assimilationsgefäße zunächst mit ihren Manometern verbunden wurden und dann die Luft aus dem überstehenden Gasraum und der Manometercapillare, unter lebhaftem Schütteln, durch Gasgemische verschiedenen Sauerstoff-

[1] WILLSTAETTER u. STOLL Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918.

partialdrucks vertrieben wurde Der Gesamtgasdruck betrug etwa 1 Atmosphäre, zur Verdunnung des Sauerstoffs diente entweder Stickstoff oder Wasserstoff Wie immer, so wurde auch hier jeder Versuch doppelt angesetzt, das eine Gefaß diente zur Bestrahlung, das zweite als Dunkelkontrolle Ein etwaiger Einfluß des Sauerstoffdruckes auf die Atmung fallt so im Resultat der Assimilationsmessung heraus, doch wurde, in Übereinstimmung mit fruheren Erfahrungen, niemals eine Beschleunigung der Atmung beobachtet, wenn der Sauerstoffdruck in den angegebenen Grenzen stieg.

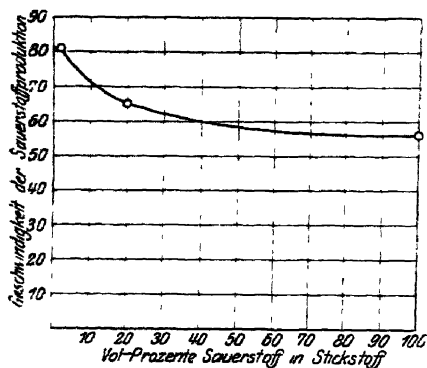



Abb 2.

Als Suspensionsflussigkeit diente ein Carbonatgemisch von 85 Teilen $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^m/_{10}$-Na_2CO_3, c_{CO_2} war demnach bei 25° $= 91 \cdot 10^{-6}$ oder sehr hoch, hinsichtlich der „hohen" und „tiefen" Bestrahlungsintensitaten gilt das in Abschnitt I Gesagte.

In Abb 2 ist ein Versuch graphisch wiedergegeben, auf der Abszissenachse sind die Volumprozente an Sauerstoff oder die Sauerstoffpartialdrucke abgetragen, die Ordinaten bedeuten die in 30 Minuten beobachteten Druckänderungen (Druckdifferenzen Hell-Dunkel) oder die Geschwindigkeiten der Sauerstoffproduktion. Die Bestrahlungsintensitat war hoch Wie man sieht, sinkt die Geschwindigkeit der Sauerstoffproduktion von 81 auf 55, wenn der Sauerstoffdruck von $^1/_{50}$ auf 1 Atmosphäre steigt, und zwar wird der Einfluß des Sauerstoffdruckes mit steigenden Sauerstoffdrucken kleiner

Tabelle 5.

25°. *Hohe Bestrahlungsintensität.* 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff

Nr. des Versuchs	Volumprozente Sauerstoff	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm	Die Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes bewirkt eine Beschleunigung der Sauerstoffproduktion um %
1	100% 2% in Wasserstoff	+ 45 + 65	44
2	100% 2% in Wasserstoff	+ 28 + 46	66
3	100% 2% in Stickstoff	+ 32 + 45	41
4	100% 2% in Stickstoff	+ 26 + 45	73

Tabelle 5 ergibt vier Versuche mit verschiedenem Zellmaterial bei Variation des Sauerstoffdruckes um das 50fache wieder und zeigt, daß der Einfluß des Sauerstoffdruckes quantitativ etwas verschieden ist. Ob der Sauerstoff mit Wasserstoff oder mit Stickstoff verdünnt wird, scheint keine Rolle zu spielen.

Bei niedrigen Bestrahlungsintensitäten war ein deutlicher Einfluß des Sauerstoffdruckes nicht festzustellen (Tabelle 6).

Tabelle 6. *25°. Niedrige Bestrahlungsintensität.*

1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Abgelesene Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm in 30 Minuten	
1	2 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff 55	100 Vol.-% Sauerstoff 58
2	2 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff 73	20 Vol.-% Sauerstoff in Stickstoff 72

Was die Deutung der Versuche betrifft, so kommen zunächst zwei Möglichkeiten in Betracht. Bei hohen Bestrahlungsintensitäten entstehen die Assimilate in hoher Konzentration und könnten, ehe sie in eine stabile Form übergehen, durch Sauerstoff zu Kohlensäure zurückoxydiert werden. Dies wäre der uninteressantere Fall. Es ist aber auch daran zu denken, daß der Sauerstoff mit dem photochemischen Primärprodukt reagiert, indem er, wie das Kohlensäurederivat, als Acceptor fungiert.

Ein hemmender Einfluß des Sauerstoffs wurde bei vielen photochemischen Vorgängen in vitro betrachtet, z. B. bei der klassischen photochemischen Reaktion, der Salzsäurebildung aus Chlorknallgas. Nach LUTHER[1] ist die Hemmung durch Sauerstoff für alle Photochlorierungen, nach WILDERMANN[2] für alle photochemischen Gasreaktionen charakteristisch.[3]

Wie man sich den Einfluß des Sauerstoffs auch vorstellen mag, immer wird man berücksichtigen, daß sich der assimilatorische Quotient mit wachsenden Sauerstoffdrucken nicht ändert, daß also in der schließlichen Bilanz kein Sauerstoff verschwinden darf.

---

[1] Zeitschr. f. physikal. Chem. 56, 43. 1906.

[2] Zeitschr. f. physikal. Chem. 42, 313. 1903.

[3] Vgl. auch WEIGERT: „Über Hemmung photochemischer Reaktionen durch Sauerstoff“. Nernst-Festschrift, S. 464.

III. Die Wirkung der Narkotica auf die Assimilation.

1. Beruht die hemmende Wirkung der Narkotica auf einer Veränderung von Grenzflächen und ist diese Veränderung angenähert der Narkoticumkonzentration an den Grenzflächen proportional, so wird für die Abhängigkeit der Wirkung von der Narkoticumkonzentration eine der FREUNDLICHschen Adsorptionsisotherme[1] ähnliche Kurve zu erwarten sein. In der Tat erhält man eine derartige Kurve, wenn man die Außenkonzentrationen des Narkoticums Phenylurethan als Abszissen, die Hemmungen der Assimilationsgeschwindigkeit als Ordinaten aufträgt.

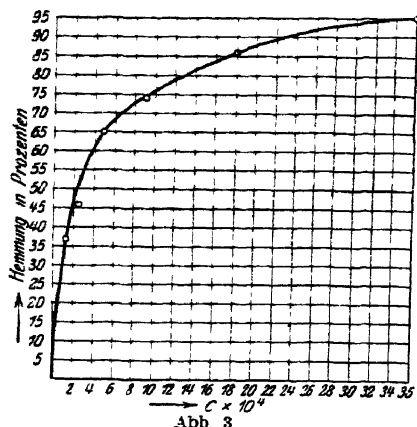



Abb. 3.

Bei den Versuchen wurden die Zellen in Gemischen von 85 Teilen $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^m/_{10}$-Na_2CO_3 unter Zusatz steigender Phenylurethanmengen suspendiert. Die Temperatur bei der Bestrahlung war 10°, c_{CO_2} somit $76 \cdot 10^{-6}$ oder so hoch, daß eine Verdoppelung der CO_2-Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit nur unerheblich steigerte. Die Bestrahlungsintensität betrug etwa 10 000 Lux, war also gleichfalls sehr hoch. Bedeutet v_0 die Assimilationsgeschwindigkeit ohne Narkoticum, v_1 die Assimilationsgeschwindigkeit bei der Narkoticumkonzentration c, so ist $\frac{v_0 - v_1}{v_0} \cdot 100$ die prozentische Hemmung der Assimilationsgeschwindigkeit, die in Abb. 3 als Ordinate aufgetragen ist. Die Abszissen entsprechen den Außenkonzentrationen an Phenylurethan.

2. Wie in früheren Versuchen die Wirkung[2] auf Atmung und Gärung innerhalb einer homologen Reihe mit der Adsorbierbarkeit zunahm, so stieg, wie zu erwarten war, in ähnlicher Weise die Wirkung auf die Assimilationsgeschwindigkeit. In Tabelle 7 sind die Konzentrationen, die eine bestimmte Hemmung der Assimilation bewirken, für die Reihe der Urethane zusammengestellt, daneben die viel höheren Konzentrationen, die die Atmung derselben Zelle um den gleichen Betrag hemmen. Die Tabelle zeigt den bekannten Anstieg der Wirkungsstärken, für die Assimilationshemmung vom Anfangsglied bis zum Endglied auf das 800fache.

[1] FREUNDLICH. Zeitschr. f. physikal. Chem. 57, 385. 1907.
[2] ASHER-SPIRO: Ergebn. d. Physiol. 14, 253. 1914.

Tabelle 7. 25⁰ *Hohe CO_2-Konzentration und hohe Bestrahlungsintensität.*

Narkoticum	Assimilationshemmung von 50% durch Millimole pro Liter	Atmungshemmung von 50% durch Millimole pro Liter
Methyl-Urethan	400	1200
Äthyl-Urethan	220	780
Propyl-Urethan	50	100
Butyl-Urethan(iso)	17	43
Amyl-Urethan(iso)	12	32
Phenyl-Urethan	0,5	6

Die Zahlen sind einer Dissertation von Fraulein ALEXANDRA V RANKE entnommen (Methode Anordnung I, Suspensionsflüssigkeit mit 4 Vol -% CO_2 gesattigte KNOPsche Lösung). Sie beziehen sich auf hohe Kohlensaurekonzentrationen und Bestrahlungsintensitaten und zeigen, daß der unter diesen Bedingungen maßgebende Teilvorgang der Assimilation eine Reaktion an Grenzflächen ist

3 Durch Untersuchung der Assimilation unter verschiedenen außeren Bedingungen ist die Möglichkeit gegeben, Wirkungen auf die einzelnen Teilvorgänge der Assimilation festzustellen. Als verschiedene außere Bedingungen kommen in erster Linie in Betracht·

hohe CO_2-Konzentration und hohe Bestrahlungsintensitat,
hohe CO_2-Konzentration und tiefe Bestrahlungsintensitat.
tiefe CO_2-Konzentration und hohe Bestrahlungsintensitat

Die Wirkung der Narkotica in den beiden ersten Fallen wurde bereits verglichen[1] und nicht sehr verschieden gefunden Die Wirkung im dritten Fall konnte fruher nicht festgestellt werden, weil in den Carbonatgemischen niedriger Kohlensaurekonzentration wohl infolge ihrer hohen OH-Ionenkonzentration, die Narkoticahemmungen vielfach irreversibel waren Spater zeigte sich, daß viele Narkotica auch in stark alkalischen Carbonatgemischen vollig reversibel hemmen wenn man nicht bei 25⁰, sondern bei 10⁰ arbeitet und die Versuche nicht langer als 2 Stunden ausdehnt Die noch bestehende Lucke konnte somit ausgefullt werden, indem die Wirkung des Phenylurethans bei Kohlensaurekonzentrationen von 76×10^{-6} Molen pro Liter (85 Teile $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teile $^m/_{10}$-Na_2CO_3) und $0.44 \cdot 10^{-6}$ Molen pro Liter (15 Teile $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 85 Teile $^m/_{10}$-Na_2CO_3) verglichen wurde, unter intensiver Bestrahlung

In Tabelle 8 ist eine derartige Beobachtungsreihe zusammengestellt. Sie zeigt, daß auch bei tiefsten Kohlensäurekonzentrationen

[1] Vgl. die I. Mitteilung.

Tabelle 8. *40°. Hohe Intensität der Bestrahlung.*
1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Phenyl-Urethan-Gewichtsprozente	Phenyl-Urethan-Mole pro Liter	Beobachtete Druckdifferenz Hell-Dunkel in mm in 60 Minuten[1]		Assimilationshemmung in Prozenten	
		$c_{CO_2} = 0{,}44 \cdot 10^{-6}$	$c_{CO_2} = 76 \cdot 10^{-6}$	$c_{CO_2} = 0{,}44 \cdot 10^{-6}$	$c_{CO_2} = 76 \cdot 10^{-6}$
0	0	33	42		
0,002	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$	26	24	21	37
0,004	$2{,}4 \cdot 10^{-4}$	21	17	36	46
0,008	$4{,}8 \cdot 10^{-4}$	18	9	46	65

Phenylurethan in ähnlicher Weise wie bei hohen Kohlensäurekonzentrationen wirkt.

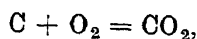
Es ist hieraus zu schließen, daß die Bindung der Kohlensäure eine Grenzflächenreaktion von ähnlicher Empfindlichkeit ist, wie die übrigen im Assimilationsmechanismus verketteten Vorgänge.

IV. Die Wirkung der Blausäure auf die Assimilation.

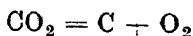
Unter bestimmten Bedingungen hemmt eine $n/_{10000}$-Blausäurelösung die Assimilation, die nach Entfernung der Blausäure wieder auf ihre normale Höhe steigt. Die Assimilation ist also gegenüber Blausäure recht empfindlich. Im Gegensatz hierzu wird die Sauerstoffatmung selbst durch die hundertfache Blausäurekonzentration, also eine $n/_{100}$-Lösung, zunächst nicht gehemmt, Sauerstoffaufnahme und Kohlensäureabgabe sind in derartigen Lösungen zunächst größer als in den blausäurefreien Kontrollösungen. Erst nach Stunden beginnt in den konzentrierten Blausäurelösungen ein hemmender Einfluß auf die Atmung merklich zu werden.

An diese Tatsachen, die in der vorhergehenden Arbeit mitgeteilt wurden, schließen die folgenden Versuche an, zu deren Verständnis eine Bemerkung über das Gaswechselgleichgewicht vorausgeschickt sei.

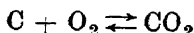
In einfachen Salzlösungen ist der respiratorische und assimilatorische Quotient für unser Versuchsobjekt nahezu gleich 1. Die Gleichung der Atmung kann somit summarisch

$$C + O_2 = CO_2,$$

[1] Da bei der hohen CO_2-Konzentration die Assimilationsgeschwindigkeit etwa 7mal so groß wie bei der niedrigen CO_2-Konzentration ist (vgl. Mitteil. I), so wurde, um in gleichen Versuchszeiten beobachten zu können, bei tiefer CO_2-Konzentration mit etwa 7mal so dichter Zellsuspension gearbeitet wie bei hoher CO_2-Konzentration.

die Gleichung der Assimilation

$$CO_2 = C + O_2$$

geschrieben werden.

Bestrahlen wir, so erhalten wir nach der einfachsten Annahme die beiden Vorgange

$$C + O_2 \rightleftarrows CO_2$$

In einer CO_2-haltigen Flüssigkeit überwiegt, je nach der Intensitat der Bestrahlung, der Vorgang von links nach rechts oder in umgekehrter Richtung, wird Sauerstoff von der Zelle aufgenommen oder Sauerstoff von der Zelle abgegeben Bei einer bestimmten Intensitat der Bestrahlung sind die Geschwindigkeiten der beiden entgegengesetzten Vorgänge gleich Es herrscht „Gaswechselgleichgewicht".

Diese einfache Auffassung ist wahrscheinlich insofern richtig, als die bestrahlte, ebenso wie die verdunkelte Zelle, Sauerstoff aufnimmt und als in der bestrahlten Zelle die Oxydation, thermodynamisch betrachtet, zur Oxydationsstufe der Kohlensaure fuhrt Die Auffassung ist insofern inkorrekt, als dieses Oxydationsprodukt nicht in allen Fallen Kohlensaure ist

Der erste Punkt folgt daraus, daß die bestrahlte Zelle wachst, also Arbeit leistet; nichts berechtigt zu der Annahme, in der bestrahlten Zelle konne unter Umgehung der Atmung Wachstumsarbeit gewonnen werden

Der zweite Punkt folgt aus der Bestrahlungskurve (Abszissen Bestrahlungsintensitaten Ordinaten Geschwindigkeiten der Sauerstoffabspaltung), die im Punkte des Gaswechselgleichgewichts keinen Knick zeigt Es bedarf mit anderen Worten der gleichen Arbeit, um ein Mol veratmeten Sauerstoffs oder ein Mol Sauerstoff aus Kohlensaure abzuspalten

Der dritte Punkt folgt aus den nachstehend beschriebenen Versuchen mit Blausaure hoher Konzentration.

a) Wirkung steigender Blausaurekonzentrationen bei hoher und konstanter Intensitat der Bestrahlung

Viele Stoffe hemmen die Assimilation vollig; es wird dann von der bestrahlten Zelle ebensoviel Sauerstoff absorbiert wie von der verdunkelten. Irgendeine Besonderheit von dem Zustand an, in dem die Sauerstoffproduktion = der Sauerstoffabsorption, der Sauerstoffwechsel also = Null ist, ist im allgemeinen nicht zu beobachten, wenn man steigende Konzentrationen eines hemmenden Stoffes einwirken laßt.

Auch in blausaurebeladenen Zellen wird zunachst die Sauerstoffproduktion nach Maßgabe der Cyanidkonzentration gehemmt. Ist jedoch der Zustand erreicht, in dem sich bei Bestrahlung Sauerstoffproduktion und Sauerstoffabsorption das Gleichgewicht halten, und laßt man die Cyanidkonzentration weiter wachsen, so beobachtet man entweder keine oder nur eine sehr geringe Zunahme der Wirkung, das heißt, der Einfluß der Bestrahlung auf den veratmeten Sauerstoff wird auch durch große Cyanidmengen nur wenig gehemmt

Um dieses Phänomen deutlich zur Anschauung zu bringen, arbeitet man am besten bei niedrigen CO_2-Konzentrationen, bei denen die Assimilation nicht allzu groß gegen die Atmung ist.

Die Zellen wurden in einem Carbonatgemisch von 15 Teilen $^{m}/_{10}$-$NaHCO_3$ und 85 Teilen $^{m}/_{10}$-Na_2CO_3 suspendiert und unter Zusatz steigender Cyanidmengen[1] bei 10° bestrahlt.

Tabelle 9. *10°. Hohe Bestrahlungsintensitat.*
$c_{CO_2} = 0{,}4 \cdot 10^{-6}$. 1 mm = 0,7 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Gesamtkonzentration an Cyanid[1]	Beobachtete Druckänderung in mm in 60 Minuten		Druckdifferenz Hell-Dunkel
		dunkel	bestrahlt	
1	0	—11	+13	24
	$0{,}8 \cdot 10^{-4}$	—13	+3	16
	$0{,}8 \cdot 10^{-3}$	—17	—2	15
2	0	—16	+8	24
	$0{,}4 \cdot 10^{-4}$	—16	+3	19
	$0{,}8 \cdot 10^{-4}$	—18	+1	19
	$0{,}8 \cdot 10^{-3}$	—25	—5	20

Tabelle 9, in der einige Beobachtungen zusammengestellt sind, zeigt, daß die Sauerstoffproduktion schon durch kleine Cyanidkonzentrationen fast vollig gehemmt wird, daß aber, wenn die Sauerstoffproduktion gehemmt ist, eine weitere Steigerung der Cyanidkonzentration um das 10fache die Lichtwirkung nicht mehr wesentlich beeinträchtigt Bei hohen Kohlensaurekonzentrationen, bei denen die Assimilation etwa das 20fache der Atmung beträgt, wird diese Erscheinung

[1] Die Außenkonzentration an freier HCN berechnet sich aus der H-Ionenkonzentration des Carbonatgemisches, die bei 18° = $2{,}8 \cdot 10^{-11}$ gefunden wurde und der Dissoziationskonstante der Blausäure $K_{18} = 4{,}7 \cdot 10^{-10}$ fur 18° zu $0{,}056 \cdot C$, wenn C die Gesamtkonzentration an Cyanid bedeutet. Die Konzentration der freien HCN in der Zelle ist hierdurch nicht gegeben, da die H-Ionenkonzentration in der Zelle unbekannt ist Aus diesem letzteren Grunde ist es zunächst nicht möglich, die Wirkungsstärke der Blausaure oder der Cyanidionen bei verschiedenen CO_2-Konzentrationen zu vergleichen.

leicht übersehen; man kann hier die Assimilation durch Cyanid um 95% hemmen, während man in den Beispielen unserer Tabelle nur bis zu einer Hemmung von 40% (Versuch 1) oder 20% (Versuch 2) kommt, je nach dem Verhältnis zwischen Assimilation und Atmung in der cyanidfreien Kontrolle.

b) *Wirkung hoher Blausäurekonzentrationen bei verschiedener Intensität der Bestrahlung*

Als Lichtquelle diente eine $^1/_2$-Wattlampe der Osramwerke, deren Stärke bei normaler Belastung in der Physikalisch-technischen Reichsanstalt zu 3500 Hefner-Kerzen bestimmt war. Durch Änderung der Entfernung zwischen Lichtquelle undAssimilationsgefäß (Anordnung III, Mitteilung I) wurden die Intensitäten der Bestrahlung um etwa das 40fache variiert.

Die Zellen waren in einem Carbonatgemisch von 85 Teilen $^m/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^m/_{10}$-Na_2CO_3 suspendiert, mit oder ohne Zusatz von Kaliumzyanid. Die Kohlensäurekonzentration war somit $91 \cdot 10^{-6}$ oder sehr hoch, der Kohlensäuredruck wurde durch „Pufferwirkung" der Carbonate konstant gehalten, so daß die beobachteten Druckänderungen solche des Sauerstoffpartialdrucks waren. Unter Cyanidkonzentration ist die Gesamtkonzentration an Cyanid (Salz + Ionen + undissoziierte Blausäure) verstanden, die Konzentration der Blausäure ist nach der früher gegebenen Formel (Abschnitt VII, erste Mitteilung) berechenbar.

Gleiche Mengen gleichkonzentrierter Zellsuspensionen wurden in Assimilationsgefäße gleichen Rauminhalts und gleicher Form eingefüllt, so daß bei einer bestimmten Intensität der auffallenden Strahlung gleiche Energiemengen absorbiert wurden.

Die Bestrahlungsintensität, bei der Gaswechselgleichgewicht herrschte, wurde durch Vorversuche mit sehr dünnen Zellsuspensionen ermittelt und zu etwa 500 Lux gefunden. Die eigentlichen Versuche wurden dann, um größere Ausschläge zu erhalten, mit dichteren Zellsuspensionen ausgeführt, der Vorversuch gab die Sicherheit, daß bei der Intensität der einfallenden Strahlung entweder Gaswechselgleichgewicht herrschte oder Sauerstoff von der Zelle aufgenommen wurde. Dieser Punkt ist wesentlich für die Reinheit der Versuchsanordnung.

Die Bestrahlungszeiten waren im allgemeinen 30 Minuten für die blausäurefreie Kontrolle bei intensiver Bestrahlung 5 Minuten, im letzteren Fall war die Messung der Atmung naturgemäß ungenau. Um bei den kurzdauernden Versuchen die Induktionsperiode vor die Zeit der Messung zu legen, wurde der Versuch erst nach vorheriger 5 Minuten langer Bestrahlung begonnen.

Bei Blausaurekonzentrationen uber $^m/_{200}$ pro Liter beginnt eine narkotische Wirkung bemerkbar zu werden; da die spezifische Blausaurewirkung dann verdeckt wird, so wurde diese Grenzkonzentration nicht uberschritten.

Tabelle 9a. 25°. $C_{CO_2} = 91 \cdot 10^{-6}$
1 mm = 0,6 cmm Sauerstoff.

Nr des Versuchs	Abstand der Lampe (3500 H.K.) vom Assimilationsgefäß in cm	Ungefähre Beleuchtungsstärke in Lux	Cyanidkonzentration in Molen pro Liter	Dauer des Versuchs in Minuten	Abgelesene Druckänderung Dunkelgefäß	Abgelesene Druckänderung bestrahltes Gefäß	Unterhalb des Gaswechselgleichgewichts in 30 Min abgespaltener Sauerstoff in mm	Oberhalb des Gaswechselgleichgewichts in 30 Min. abgespaltener Sauerstoff in mm
1	285	440	0	30	— 37	— 20	17	
	285	440	$^1/_{1000}$	30	— 49	— 31	18	
	43	19000	0	5	— 2 (± 3)	+ 74		444
	43	19000	$^1/_{1000}$	30	— 46	+ 16		16
2	285	440	0	30	— 36	— 16	20	
	285	440	$^1/_{500}$	30	— 40	— 23	17	
	43	19000	0	5	— 2 (± 3)	+ 80		480
	43	19000	$^1/_{500}$	30	— 46	+ 4		4
3	285	440	0	30	— 27	— 11	16	
	285	440	$^1/_{200}$	30	— 34	— 17	17	
	43	19000	0	5	— 2 (± 3)	— 49		294
	43	19000	$^1/_{200}$	30	— 29	— 2		0

Die Zahlen, die in Tabelle 9a zusammengestellt sind, zeigen, daß $^n/_{400}$-Blausaurelösungen die Sauerstoffabspaltung aus Kohlensaure vollig hemmen, bei der hohen Bestrahlungsintensitat von 19000 Lux ist die Zelle nicht mehr imstande, einen positiven Druck zu entwickeln Gleichwohl spaltet eine bestimmte Menge Strahlung niedriger Intensitat den veratmeten Sauerstoff aus blausaurebeladenen Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit ab, wie aus blausaurefreien Zellen Hohe Cyanidkonzentrationen lassen also den photochemischen Reaktionsmechanismus an sich — wie aus der Wirkung auf den in der Atmung gebundenen Sauerstoff hervorgeht — intakt, heben aber die photochemische Reaktionsfahigkeit der Kohlensaure auf

c) $^n/_{10000}$-*Blausaurelösungen* hemmen die Assimilation bei hoher Intensitat der Bestrahlung, sind jedoch ohne Wirkung bei niedriger Intensität der Bestrahlung (Abschnitt VII, Mitteilung I). Nachdem sich in den Versuchen mit hohen Blausaurekonzentrationen gezeigt hatte,

daß wir photochemische Vorgänge unterhalb und oberhalb des Gaswechselgleichgewichts zu unterscheiden haben, erschien es erwünscht, die Versuche mit niedrigen Blausäurekonzentrationen daraufhin nachzuprüfen, ob auch hier der Punkt des Gaswechselgleichgewichts das Gebiet der Wirkung von dem der Wirkungslosigkeit trennte. Ersieht man schon aus den früher mitgeteilten Zahlen, daß dies nicht der Fall ist, so gebe ich doch einen kürzlich zur Nachprüfung ausgeführten Versuch wieder, da es sich um eine für das Verständnis der Kohlensäureassimilation grundlegende Tatsache handelt.

Die Bestrahlungsintensität wurde so gewählt, daß in der blausäurefreien Kontrolle das Gaswechselgleichgewicht etwa um den Betrag der Atmung überschritten wurde, die Assimilation also etwa zur Hälfte in der Aufhebung der Atmung, zur Hälfte in Produktion von Sauerstoff aus Kohlensäure bestand.

Als Suspensionsflüssigkeit diente dasselbe Carbonatgemisch, wie in b, die Gesamtkonzentration an Cyanid war $^n/_{10000}$.

Aus Tabelle 9b geht hervor, daß eine $^n/_{10000}$-Cyanidlösung, die bei hoher Bestrahlungsintensität um 65% hemmt, bei tiefer Bestrahlungsintensität wirkungslos ist; bei tiefer Bestrahlungsintensität sind die Ausschläge mit und ohne Cyanid 61, eine Zahl, die in beiden Fällen zu einem erheblichen Bruchteil Sauerstoffabspaltung aus Kohlensäure anzeigt. Dieser Bruchteil ist für die blausäurehaltige Zelle etwas kleiner, weil die Atmung durch Blausäure beschleunigt ist.

Tabelle 9b. 25°. $C_{CO_2} = 91 \times 10^{-6}$. 1 mm = 0,6 cmm Sauerstoff.

Abstand der Lampe (3500 H.K.) in cm	Ungefähre Beleuchtungsstärke in Lux	Cyanidkonzentration in Molen pro Liter	Dauer des Versuchs in Minuten	Abgelesene Druckänderung Dunkelgefäß	Abgelesene Druckänderung bestrahltes Gefäß	Druckdifferenz Hell-Dunkel	Assimilation in 30 Min. in mm
142	1800	0	30	— 29	— 32	61	**61**
142	1800	$^1/_{10000}$	30	— 39	— 22	61	**61**
43	19000	0	5	— 4	— 86	90	**540**
43	19000	$^1/_{10000}$	5	— 5	— 27	32	**192**

Es ergibt sich somit, daß hier nicht diejenige Bestrahlungsintensität, bei der Gaswechselgleichgewicht herrscht, das Gebiet der Wirkung von dem der Wirkungslosigkeit trennt, sondern die kritische Bestrahlungsintensität liegt höher. In $^n/_{10000}$-Blausäurelösungen wird mit anderen Worten Kohlensäure noch photochemisch gespalten, die Geschwindigkeit dieser Spaltung, die in maximo erreicht werden kann, ist jedoch gegenüber blausäurefreien Zellen herabgesetzt.

Zusammenfassung.

Blausaure hemmt die photochemische Sauerstoffabspaltung aus Kohlensaure, nicht aber die Sauerstoffabspaltung aus Zwischenprodukten der Atmung, denn bei vollig gehemmter Kohlensaurespaltung wird der veratmete Sauerstoff aus blausaurebeladenen Zellen mit der gleichen photochemischen Ausbeute abgespalten, wie aus blausaurefreien Zellen

Sehen wir von der sehr unwahrscheinlichen Annahme ab, daß Blausaure den Eintritt der Kohlensaure in die Zelle verhindert, so folgt

1 Kohlensaure wird in der bestrahlten grunen Zelle erst nach einer chemischen Umwandlung reduziert

2 Die Wirkung der Blausaure auf die Assimilation besteht lediglich darin, daß sie diese Umwandlung hemmt, der photochemische Reduktionsmechanismus an sich wird durch Blausaure nicht beeinflußt

3 Zwischenprodukte der Atmung konnen im Gegensatz zur Kohlensaure direkt photochemisch reduziert werden

4 In der bestrahlten blausaurebeladenen Zelle entsteht keine Atmungskohlensaure

V Die assimilierende Zelle als Photolyt

Physikalisch-chemische Vorbemerkung Wie bei der Elektrolyse sind bei der Photolyse[1] primare und sekundare Reaktionen zu unterscheiden Die Primarreaktion besteht stets in einer Veranderung des absorbierenden Molekuls, die Sekundarreaktionen spielen sich zwischen den photochemischen Primarprodukten untereinander oder zwischen diesen und anderen Bestandteilen des Photolyten ab

Bei der Photolyse des Bromwasserstoffs[2] ist die Primarreaktion $HBr = Br + H$, sekundare Reaktionen sind $H + HBr = H_2 + Br$, sowie $Br + Br = Br_2$ Bei der Photobromierung des Hexahydrobenzols[3] ist die Primarreaktion $Br_2 = Br + Br$, sekundar ist die Reaktion zwischen den freien Bromatomen untereinander und die Reaktion zwischen freien Bromatomen und dem Hexahydrobenzol

Bestandteile des Photolyten, die mit den photochemischen Primarprodukten reagieren, nennt man Acceptoren. In dem Photolyten Brom + Hexahydrobenzol ist das Hexahydrobenzol der Acceptor

---

[1] Warburg, E.: „Uber die Anwendung der Quantenhypothese auf die Photochemie", Die Naturwissenschaften 1917, Heft 30

[2] Warburg, E.: Zusammenfassung in Zeitschr f Elektrochemie 26, 54. 1920.

[3] Nernst: Zeitschr f Elektrochemie 1918, S 335

Die Zahl n der bei Bestrahlung eines Photolyten primär umgewandelten Moleküle fand E. Warburg[1] in einigen Fällen, in Übereinstimmung mit Einsteins[2] photochemischem Äquivalentgesetz

$$= \frac{Q}{h\nu}$$

worin $h = 1{,}56 \cdot 10^{-34}$, wenn ν die Schwingungszahl der wirksamen Strahlung pro Sekunde, Q die absorbierte Strahlung in Grammcalorien bedeutet.

Kinetik der Assimilation[3]. Die Assimilation ist keine einfache Photolyse der Kohlensäure.

Der photochemische Primärvorgang, in dem Sauerstoff nicht abgespalten wird, besteht in einer Wirkung auf das Chlorophyllmolekül und führt zur Bildung des photochemischen Primärprodukts. Die Bildungsgeschwindigkeit des photochemischen Primärprodukts ist der in der Zeiteinheit absorbierten Strahlung proportional. Die Konzentration des photochemischen Primärprodukts ist durch die Geschwindigkeit der Bildung und des Verbrauchs bestimmt.

Das photochemische Primärprodukt reagiert in Sekundärreaktionen mit dem Acceptor.

Acceptor ist nicht die Kohlensäure, sondern ein Kohlensäurederivat, das sich in der Zelle in einer Kette von chemischen Reaktionen bildet. Zu dem photochemischen Primärvorgang und den Sekundärreaktionen kommt so in der Zelle eine dritte Klasse von Reaktionen, die der Acceptorbildung. Die Acceptorbildung ist eine Folge freiwillig verlaufender Reaktionen, die ohne Bestrahlung durch Anhäufung der Endprodukte schnell zum Stillstand kommen. Bei Bestrahlung werden diese Endprodukte — die Acceptoren — in der Sekundärreaktion verbraucht, wobei das Dunkelgleichgewicht gestört wird.

Sowohl die Reaktionen, die zur Bildung des Acceptors führen, als auch die Reaktion des Acceptors mit dem photochemischen Primärprodukt sind Reaktionen an Oberflächen und in ihrem Ablauf außerordentlich empfindlich gegenüber Veränderungen des Oberflächenmilieus.

[1] Warburg, E.: Zusammenfassung in Zeitschr. f. Elektrochemie 26, 54, 1920.

[2] Einstein: Annal. d. Physik, 17, 132, 1905; 37, 832, 1912.

[3] *Zusatz beim Neudruck.* Ich habe diese Theorie, da sie unfruchtbar war, später wieder aufgegeben (vgl. die folgende Arbeit mit Uyesugi über die Blackmansche Reaktion). Trotzdem ist sie als Möglichkeit lehrreich und deshalb in diese Sammlung aufgenommen worden.

Im Gegensatz zu der Sekundarreaktion wird die Acceptorbildung durch kleine Blausäuremengen gehemmt. Da die Blausaurewirkung wahrscheinlich in einer Überfuhrung von Schwermetallen aus einer wirksamen Form in unwirksame Komplexverbindungen besteht, so ist bei der Acceptorbildung an die Mitwirkung eines Schwermetalls zu denken.

Alle Beeinflussungen der Assimilation in der lebenden Zelle betreffen die Acceptorbildung oder Sekundarreaktionen, eine Beeinflussung der Primärreaktion in der lebenden Zelle durfte bis jetzt noch nicht beobachtet sein

Wollte man nach dieser Auffassung eine photochemische Reaktion in vitro, etwa die Photochlorierung des Benzols, dem Assimilationsvorgang ahnlich leiten, so wurde man das Chlor in der waßrigen Phase eines heterogenen Systems losen, in diesem das Benzol in einer Grenzflachenreaktion entstehen lassen und die bei Belichtung gebildeten Chloratome an den Grenzflachen mit dem Benzol zur Reaktion bringen In diesem Modell ware die photochemische Primarreaktion die Spaltung der Chlormolekule in Chloratome, die Acceptorbildung die Entstehung des Benzols; die Sekundarreaktionen bestanden, je nach der Bestrahlungsintensitat und der Geschwindigkeit der Benzolbildung, vorwiegend in der Chlorierung des Benzols durch freie Chloratome oder in der Wiedervereinigung der durch Bestrahlung gebildeten Chloratome zu Chlormolekulen

Fehlt es in dem Modell an Acceptor, so gehen die primar gebildeten freien Chloratome wieder zu Chlormolekulen zusammen oder die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes, des Chlors, bleibt konstant Bei Gegenwart des Acceptors nimmt die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes in dem Photolyten ab, indem Chlor in das Benzolmolekul eintritt Bei der Assimilation bleibt die Menge des lichtabsorbierenden Stoffes, des Chlorophylls, in beiden Fallen, bei Gegenwart und bei Abwesenheit des Acceptors, konstant, wie aus Willstaetters[1] Chlorophyllbestimmungen vor und nach Bestrahlung folgt Das Modell unterscheidet sich in diesem wesentlichen Punkt von der lebenden Zelle.

Alle den Primarvorgang betreffenden Hypothesen haben zu berucksichtigen, daß die Bilanz des Assimilationsprozesses $CO_2 = C + O_2$ ist, andere Spaltungen somit im Kreislauf des Assimilationsprozesses wieder ruckgängig gemacht werden und in der Summe der Reaktionsgleichungen verschwinden mussen

Der Primarvorgang Bestrahlt man eine Zelle mit konstanter Intensitat, so wird im photochemischen Primarvorgang in gleichen Zeiten

[1] loc. cit

die gleiche Anzahl von Molekülen verändert; gleichwohl ist die Sauerstoffentwicklung, wenn nach Verdunkelung mit konstanter Intensität bestrahlt wird, zunächst klein und steigt erst allmählich zu einem konstanten Endwert an. Diese Erscheinung kann nicht so gedeutet werden, daß sich in der Dunkelperiode Stoffe anhäufen, die den bei Bestrahlung gebildeten Sauerstoff, etwa in statu nascendi, zunächst wegfangen, in diesem Fall müßte die Induktionsperiode um so länger sein, je niedriger die Bestrahlungsintensität, während die tatsächlichen Verhältnisse umgekehrt liegen. Vielmehr folgt aus den Beobachtungen über die Induktion, 1. daß in dem Primärvorgang kein Sauerstoff abgespalten wird, und 2. daß in dem Primärvorgang keine Stoffe entstehen, die freiwillig (in Dunkelreaktionen) Sauerstoff abspalten. Auch der zweite Punkt ist wichtig; er ergibt sich aus der Anlage der Induktionsversuche, in denen die Lichtwirkung stets nach Verdunkelung, nachdem die Druckdifferenz zwischen dem bestrahlten Gefäß und der Dunkelkontrolle konstant geworden war, abgelesen wurde.

Punkte 1 und 2 sind das einzige Sichere, was sich über den Primärvorgang aussagen läßt, sie machen es wahrscheinlich, daß der Primärvorgang nicht das Kohlensäuremolekül betrifft.

Die Möglichkeit, an eine primäre Veränderung der Kohlensäure zu denken, war durch eine Beobachtung WILLSTÄTTERS gegeben, nach der sich die Kohlensäure unter gewissen Bedingungen in vitro an das Chlorophyllmolekül anlagert. Anderseits war die quantentheoretische Betrachtungsweise von vornherein der Annahme einer primären Lichtwirkung auf das Kohlensäuremolekül nicht günstig. Nach EINSTEIN[1] wird von einem absorbierenden Molekül stets nur ein Elementarquantum Strahlung aufgenommen, bezeichnen wir das Elementarquantum der wirksamen Strahlung mit $h\nu$, so ist Bedingung für die Zersetzung, worauf E. WARBURG[2] zuerst aufmerksam machte, $h\nu > \frac{A}{N_0}$, hier bedeutet A die Arbeit, deren es zur Zersetzung eines Grammoleküls bei der Versuchstemperatur bedarf, N_0 die Avogadrosche Zahl.

$h\nu$ ist für die assimilatorisch wirkende Wellenlänge $0{,}77\,\mu = 5{,}99 \cdot 10^{-20}$

$\frac{A}{N_0}$ ist für $CO_2 = C + O_2$ bei Zimmertemperatur[3] $= \frac{98000}{6{,}17 \cdot 10^{23}} = 15{,}9 \times 10^{-20}$

für $CO_2 = CO + \frac{1}{2} O_2$ „ „ [3] $= \frac{66000}{6{,}17 \cdot 10^{23}} = 10{,}8 \cdot 10^{-20}$

Die Bedingung $h\nu > \frac{A}{N_0}$ ist also nicht erfüllt oder die beiden einfachen Vorgänge $CO_2 = C + O_2$ und $2\,CO_2 = 2\,CO + O_2$ waren als photochemische Primärreaktionen auszuschließen.

---

[1] loc. cit.

[2] Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss., Physik.-mathem. Klasse, 1914, 884.

[3] POLLITZER, F., Berechnung chemischer Affinitäten. Stuttgart 1912.

Acceptorbildung. Von bestimmten hohen CO_2-Konzentrationen und Bestrahlungsintensitäten an läßt sich die Geschwindigkeit der Assimilation weder durch Erhöhung der CO_2-Konzentration noch durch Erhöhung der Bestrahlungsintensität steigern; unter diesen Bedingungen entspricht einer Temperatursteigerung von 15° auf 25° etwa eine Verdoppelung der Assimilationsgeschwindigkeit. Mit diesen von BLACKMAN[1] gefundenen Tatsachen beginnt die physikalisch-chemische Aufklärung der Assimilation, sie zeigen, daß im Mechanismus der Kohlensäurereduktion eine langsam verlaufende chemische Reaktion eine Rolle spielt.

Es war ein Fortschritt gegenüber früheren Versuchen, daß wir mit isolierten, sehr kleinen Zellen arbeiteten; dank des kurzen Diffusionsweges von der Außenfläche der Zelle bis zu den Reaktionsorten war hier die Nachdiffusion der Kohlensäure, auch bei den niedrigsten Kohlensäurekonzentrationen, als geschwindigkeitsbestimmender Faktor ausgeschaltet. In allen folgenden Überlegungen können wir somit von der Nachdiffusion der Kohlensäure absehen (Abschnitt III, erste Mitteilung).

Der Theorie der Acceptorbildung stelle ich die Tatsachen, auf denen sie beruht, voran. Sie beziehen sich sämtlich auf hohe Intensitäten der Bestrahlung.

1. Nachweis einer chemischen Bindung der Kohlensäure im Mechanismus der Assimilation. Bei niedrigen Kohlensäurekonzentrationen, bei denen die Assimilationsgeschwindigkeit proportional der Kohlensäurekonzentration wächst, entspricht einer Temperaturerhöhung von 5° auf 10° etwa eine Verdopplung der Geschwindigkeit. Für ein Intervall von 10° berechnet sich der hohe, zweifellos „chemische" Koeffizient von 5 (Abschnitt V, erste Mitteilung).

2. Derselbe Nachweis von anderer Seite. In der bestrahlten blausäurebeladenen Zelle kann Kohlensäure nicht reduziert werden, während der photochemische Reduktionsmechanismus anderen Stoffen gegenüber intakt ist (Abschnitt IV, diese Mitteilung).

3. Nachweis einer chemischen Reaktion, deren Geschwindigkeit von der Konzentration der Kohlensäure unabhängig ist: Neben den erwähnten Versuchen BLACKMANS der Erfolg intermittierender Bestrahlung kurzer Periodendauer. Eine bestimmte Menge absorbierter Strahlung zersetzt mehr Kohlensäure, wenn die Bestrahlung durch kurze Dunkelperioden unterbrochen wird, als bei kontinuierlicher Einwirkung; dies bei hohen Kohlensäurekonzentrationen, deren Steigerung die Assimilation nicht beschleunigt (Abschnitt VI, erste Mitteilung).

[1] Optima and limiting Factors, Annals of Botany 19, 281. 1905.

4. Trägt man die Kohlensäurekonzentrationen als Abszissen, die Geschwindigkeiten der Kohlensäurespaltung als Ordinaten auf, so erhält man eine Kurve, die zunächst geradlinig ansteigt, sich dann allmählich zur Abszissenachse krümmt und schließlich der Abszissenachse parallel wird (Abschnitt III, erste Mitteilung).

Gehen wir von der Form der Kurve aus, so macht sie es wahrscheinlich, daß die beiden im Mechanismus der Assimilation nachgewiesenen Reaktionen in direktem Zusammenhang stehen, sei es, daß auf eine schnell bis zu einem Gleichgewicht (Dissoziationsgleichgewicht) verlaufende Reaktion eine langsame folgt, sei es, daß wir es mit zwei langsam verlaufenden gekoppelten Reaktionen zu tun haben. Ohne zwischen diesen beiden Möglichkeiten schon jetzt eine Entscheidung treffen zu wollen, gebe ich zunächst der zweiten Auffassung den Vorzug, weil die Assimilationsgeschwindigkeit durch einige Stoffe in dem Anfangsteil und dem Endteil der Kurve in verschiedener Weise beeinflußt wird. Wir nehmen also zwei langsam verlaufende gekoppelte Reaktionen an; in diesen soll die Kohlensäure unter intermediärer Bindung an einen Zellbestandteil chemisch verändert werden, das entstehende Endprodukt sei der photochemische Acceptor der Kohlensäureassimilation.

Bezeichnen wir die Gesamtmenge des wirksamen Zellbestandteils mit B, seine jeweilige Menge in freiem Zustand mit x, so ist die in gebundenem Zustand vorhandene Menge $= B - x$. Für die Geschwindigkeiten v_1 und v_2 der gekoppelten Reaktionen erhalten wir im einfachsten Fall

$$v_1 = c_{CO_2} \cdot x k_1 \qquad (1)$$

$$v_2 = (B - x) k_2 \qquad (2)$$

wo k_1 und k_2 chemische Geschwindigkeitskonstanten bedeuten. Im stationären Zustand ist $v_1 = v_2$, folglich

$$c_{CO_2} x k_1 = (B - x) k_2 \qquad (3)$$

Aus (1) und (3) ergibt sich nach Elimination von x die Geschwindigkeit der Assimilation im stationären Zustand

$$v = c_{CO_2} k_1 \cdot \frac{B k_2}{c_{CO_2} k_1 + k_2} \qquad (4)$$

eine Gleichung, die die beobachtete Abhängigkeit der Assimilationsgeschwindigkeit von der CO_2-Konzentration befriedigend wiedergibt. Für kleine Werte von c_{CO_2} wird

$$v = c_{CO_2} B k_1 \qquad (5)$$

oder proportional der CO_2-Konzentration, für große Werte von c_{CO_2} wird

$$v = B k_2$$

oder unabhängig von der CO_2-Konzentration.

Es bestimmen also, je nachdem c_{CO_2} groß oder klein ist, verschiedene Reaktionen die Geschwindigkeit der Assimilation

Sekundarreaktion und Acceptorbildung Wie in dem Modell der Photochlorierung je nach der Intensitat der Bestrahlung die Acceptorbildung oder die Reaktion zwischen Acceptor und freien Chloratomen die Geschwindigkeit der Chlorierung bestimmt, so ist fur die Geschwindigkeit der Assimilation bei hoher Intensitat der Bestrahlung die Acceptorbildung, bei niedriger Intensitat der Bestrahlung die Reaktion zwischen Acceptor und photochemischem Primarprodukt maßgebend

Die Grundlage dieser Theorie bilden folgende Tatsachen, die sich samtlich auf hohe CO_2-Konzentration beziehen·

1 Laßt man bei hoher konstanter Kohlensaurekonzentration die Bestrahlungsintensitat wachsen, so steigt die Kurve (Abszissen. Bestrahlungsintensitäten, Ordinaten. Assimilationsgeschwindigkeiten) zunachst geradlinig, krummt sich dann allmahlich zur Abszissenachse und wird schließlich dieser parallel (Abschnitt IV, erste Mitteilung)

2 Oberflachenaktive Stoffe hemmen die Assimilationsgeschwindigkeit in dem geraden Anfangsteil der Kurve, also bei sehr niedrigen Intensitaten der Bestrahlung; da diese Stoffe die Absorption nicht verandern, so folgt, daß hier nicht nur die Lichtabsorption oder — was dasselbe besagt — der photochemische Primarvorgang fur die Geschwindigkeit der Assimilation maßgebend sind, sondern außerdem noch ein chemischer Vorgang an Grenzflächen (Abschnitt VII, erste Mitteilung)

3. Hemmt eine bestimmte Blausaurekonzentration die Assimilationsgeschwindigkeit bei intensiver Bestrahlung um 50%, so ist die gleiche Blausaurekonzentration bei schwacher Bestrahlung wirkungslos Im Verein mit 2 folgt hieraus, daß bei hohen und tiefen Bestrahlungsintensitaten verschiedene chemische Vorgange die Geschwindigkeit der Assimilation bestimmen (Abschnitt III, diese Mitteilung)

4 Aus den Versuchen mit intermittierender Bestrahlung ergibt sich, daß nach intensiver Bestrahlung Teilvorgange der Assimilation im Dunkeln noch weitergehen Ohne Bestrahlung nimmt die Geschwindigkeit dieser Vorgange im Lauf einer $^1/_{100}$ Sekunde schon merklich ab und wird bei langerer Dauer der Dunkelperioden sehr klein Bei Unterbrechung der Bestrahlung kommt es also schnell zur Einstellung von „Dunkelgleichgewichten“ (Abschnitt VI, erste Mitteilung)

Bezeichnen wir mit c_A die Konzentration des Acceptors, mit c_i die Konzentration des photochemischen Primarprodukts, die bei niedriger der Bestrahlungsintensitat dieser proportional sein soll, so ist die Geschwindigkeit der Assimilation im einfachsten Fall

$$v = c_A c_i k_3 \qquad (7)$$

worin k_3 eine chemische Geschwindigkeitskonstante bedeutet

Der Acceptor bilde sich bei konstanter CO_2-Konzentration mit der konstanten Geschwindigkeit K, die Acceptorbildung sei eine umkehrbare Reaktion, die schon bei kleinen Acceptorkonzentrationen zum Stillstand komme Wir erhalten dann zunachst ohne Bestrahlung

$$\frac{dc_A}{dt} = K - c_A k_4 \tag{8}$$

oder im „Dunkelgleichgewicht"

$$K = c_A' k_4 \qquad \left(\frac{dc_A}{dt} = o\right)$$

$$c_A' = \frac{K}{k_4} \tag{9}$$

wenn wir mit c_A' die Acceptorkonzentration im Dunkelgleichgewicht bezeichnen

Bei Bestrahlung (aus 7 und 8)

$$\frac{dc_A}{dt} = K - c_A k_4 - c_A c_i k_3$$

Im stationaren Zustand

$$K = c_A k_4 + c_A c_i k_3 \qquad \left(\frac{dc_A}{dt} = o\right)$$

$$c_A = \frac{K}{c_i k_3 + k_4} \tag{10}$$

Aus (7) und (10)

$$v = c_i k_3 \frac{K}{c_i k_3 + k_4} \tag{11}$$

eine Gleichung, die das Abhangigkeitsverhaltnis zwischen Assimilationsgeschwindigkeit und Bestrahlungsintensitat befriedigend wiedergibt Fur kleine Werte von c_i wird

$$v = c_i k_3 \frac{K}{k_4}$$

oder indem wir $K = c_A'$ = der Acceptorkonzentration im Dunkelgleichgewicht (Gleichung (9)) setzen

$$v = c_i c_A' k_3 \tag{12}$$

das heißt, die Assimilationsgeschwindigkeit ist proportional c_i oder der Intensitat der Bestrahlung

Fur große Werte von c_i wird

$$v = K \tag{13}$$

oder unabhangig von der Intensitat der Bestrahlung

Diese Auffassung macht es verständlich, daß die Assimilation bei tiefen und hohen Bestrahlungsintensitäten in verschiedener Weise beeinflußt werden kann, indem im ersten Fall die Sekundärreaktion, im zweiten Fall die Acceptorbildung der maßgebende Vorgang ist.

VI. *Reduktion der Salpetersäure in der lebenden Zelle.*

Nach der im vorhergehenden Abschnitt entwickelten Auffassung ist die Reduktion der Kohlensäure in der bestrahlten grünen Zelle ein sekundärer Vorgang, während der photochemische Primärvorgang, gleichgültig, ob Kohlensäure vorhanden ist oder nicht, in dem bestrahlten Chlorophyllkorn stets derselbe ist. Trifft diese Auffassung zu, so ist zu erwarten, daß bei Bestrahlung nicht nur Kohlensäure, sondern auch andere Stoffe reduziert werden. Von diesem Gesichtspunkt aus wurde eine Reihe sauerstoffreicher organischer und anorganischer Substanzen, unter Ausschluß von Kohlensäure, geprüft.

Bestrahlt man in dem Assimilationsgefäß eine mit Luft gesättigte Zellsuspension, wobei die Suspensionsflüssigkeit etwa eine $^{n}/_{10}$-NaCl-Lösung sei, so werden zunächst die kleinen Kohlensäuremengen, die in dem Gasraum, der NaCl-Lösung und der Zelle selbst enthalten sind, in Sauerstoff umgewandelt, ein Vorgang, der in dem angeschlossenen Manometer zum Auftreten eines positiven Drucks führt. Bei geeigneten Abmessungen der Zellmengen, der Gas- und Flüssigkeitsräume, sowie bei hohen Bestrahlungsintensitäten sind diese kleinen Kohlensäuremengen schnell umgewandelt, und man beobachtet nun weiterhin eine ganz geringfügige Sauerstoffentwicklung, die wir als „Restassimilation" bezeichnen wollen und die, solange die Zelle am Leben ist, nie völlig erlischt.

Neben der Restassimilation bewirkt Bestrahlung die Aufhebung der Atmung, nach der alten Auffassung, indem die Atmungskohlensäure in Sauerstoff und Kohlenstoffhydrat zurückverwandelt wird, nach Abschnitt IV vielleicht in anderer Weise. Diese zweite Wirkung der Bestrahlung führt in dem angeschlossenen Manometer zu keiner Druckänderung, bei einem respiratorischen Quotienten von 1 wird der in der Atmung verbrauchte Sauerstoff quantitativ an den Gasraum wieder abgegeben.

Entsprechend diesen Überlegungen waren die Versuche so angeordnet, daß zwei Assimilationsgefäße mit gleichen Mengen luftgesättigter Zellsuspension beschickt und mit etwa 10000 Lux bestrahlt wurden; die Suspensionsflüssigkeit in dem einen Assimilationsgefäß war eine indifferente Lösung, etwa eine $^{n}/_{10}$-Natriumchlorid- oder Kaliumphosphatlösung, die Suspensionsflüssigkeit in dem zweiten Gefäß enthielt

die zu prüfende Substanz, deren Reduktion durch eine Mehrausscheidung von Sauerstoff angezeigt werden mußte.

Bei derartigen Versuchen ergab sich zunächst, daß in einer Natriumnitratlösung stets mehr Sauerstoff im Gasraum erschien als in Chlorid-, Sulfat- oder Phosphatlösungen. Die Ausschläge waren jedoch nicht so groß, daß mit Sicherheit auf eine Abspaltung von Sauerstoff aus Nitrat geschlossen werden konnte. Ähnlich geringe Ausschläge wie mit Nitrat wurden mit verdünnten Lösungen freier Salpetersäure erhalten. Sehr erheblich wurde die Sauerstoffabscheidung jedoch, als die freie Salpetersäure nicht in Wasser, sondern in $n/_{10}$-Natriumnitrat gelöst wurde, wahrscheinlich, weil nicht die Ionen, sondern nur die undissoziierten Säuremoleküle mit einiger Geschwindigkeit in die Zelle eindringen. In $n/_{100}$-Salpetersäure-, $n/_{10}$-Natriumnitratlösungen war die Reduktion so lebhaft, daß in 8 Stunden bei 25° etwa 10% des Trockengewichts der Zelle an Sauerstoff abgeschieden wurde. Hierbei blieb die Zelle völlig grün, teilungsfähig und von unverändertem Assimilationsvermögen gegenüber Kohlensäure. Die Herkunft des Sauerstoffs aus Zellbestandteilen erscheint demnach ausgeschlossen. Bei längerer Versuchsdauer ging die Zelle allmählich unter Verfärbung zugrunde.

Die Wirkung auf die Sauerstoffabscheidung sank nur unerheblich, wenn die kurzwelligen Strahlen durch eine Rotscheibe aus dem Licht der Metallfadenlampe fortgenommen wurden.

Mit der Sauerstoffabspaltung aus der Salpetersäure ist eine Ammoniakabscheidung in die umgebende Flüssigkeit verbunden, wobei jedoch weniger Ammoniak erscheint, als sich, unter Annahme einer quantitativen Reduktion der Salpetersäure zu Ammoniak, aus der Menge des abgespalteten Sauerstoffs berechnet.

Was den Reaktionsverlauf anbetrifft, so ist es zweifelhaft, ob die Salpetersäure direkt reduziert wird, oder ob sie zunächst in einer durch Bestrahlung beschleunigten Reaktion mit Zellbestandteilen unter Kohlensäurebildung reagiert und die Sauerstoffabspaltung dann auf dem normalen Wege der Kohlensäureassimilation erfolgt. Mit der letzteren Möglichkeit muß gerechnet werden, weil in den salpetersauren Lösungen ohne Bestrahlung stets Kohlensäure abgeschieden wird, deren Sauerstoff wahrscheinlich aus der Salpetersäure stammt, allerdings in sehr viel kleineren Mengen, als es die bei Bestrahlung abgeschiedenen Sauerstoffmengen sind. Die Entscheidung dieser Frage, die nicht ganz einfach ist, muß einer folgenden Mitteilung über Nitratassimilation vorbehalten bleiben.

Einige Beobachtungen über die Sauerstoffabscheidung der bestrahlten Zellen bei Ausschluß von Kohlensäure, in salpetersäurehaltigen und salpetersäurefreien Lösungen, seien schließlich in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10. 25°. Ca. 10000 Lux.
1 mm = 0,88 cmm Sauerstoff.

Nr. des Versuchs	Suspensionsflüssigkeit	Versuchszeit in Min	Beobachtete Druckänderung in mm	Bemerkungen
1	$^m/_{10}$-KH_2PO_4	30	− 12	
		30	− 8	
		30	+ 3	
	$^m/_{10}$-$NaNO_3$, $^m/_{100}$-HNO_3	30	− 101	
		30	− 100	
		30	− 82	
2	$^m/_{10}$-KH_2PO_4	30	− 8	
		30	+ 5	
		30[1]	+ 2	
	$^m/_{10}$-$NaNO_3$, $^m/_{100}$-HNO_3	30	+ 111	
		30	+ 115	
		30[1]	+ 72	
3	$^m/_{10}$-KH_2PO_4	30	+ 3	
		30	+ 3	
	$^m/_{10}$-$NaNO_3$, $^m/_{100}$-HNO_3	30	+ 57	Mit Rotscheibe[2]
		30	+ 61	Ohne Rotscheibe
4	$^m/_{10}$-NaCl	100	+ 30	
	$^m/_{10}$-NaCl, $^m/_{100}$-HCl	100	+ 37	
	$^m/_{10}$-NaCl, $^m/_{50}$-HCl	100	+ 36	
	$^m/_{10}$-$NaNO_3$, $^m/_{100}$-HNO_3	100	+ 510	

[1] Nach dazwischen liegender 5stündiger Bestrahlung.
[2] Rotfilter von Schott & Gen., Jena, F 4512, 1 mm dick, praktisch undurchlässig für Wellenlängen unter 610 $\mu\mu$.

Herrn ERWIN NEGELEIN spreche ich auch hier für seine Mitarbeit meinen Dank aus.

Biochem. Zeitschr. 110, 66. 1920

Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen.

Von

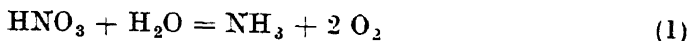
Otto Warburg und Erwin Negelein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 28. Juni 1920.)

Mit 1 Abbildung

1. Neben einigen Bakterien und Schimmelpilzen sind es vor allem die autotrophen Pflanzen, die ihren Stickstoffbedarf aus Nitraten decken. Der Stickstoff der Salpetersäure geht hierbei in die Reduktionsstufe des Ammoniaks über, mit der Assimilation des Stickstoffs ist also, summarisch betrachtet, folgender Reduktionsvorgang verbunden:

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\ O_2 \qquad (1)$$

2. Als SCHIMPER[1] fand, daß der Nitratgehalt grüner Blätter nur bei Bestrahlung merklich abnahm, sprach er die Vermutung aus, die Nitratassimilation in grünen Pflanzen sei ein lichtchemischer Vorgang und als solcher der Kohlensäureassimilation an die Seite zu stellen. In der Form, in der sie geäußert wurde, hat diese Auffassung einer späteren Kritik nicht standgehalten. Die Stickstoffbilanzen, die GODLEWSKI[2] für dunkel und hell gezogene Weizenkeimlinge aufstellte, lassen keinen Zweifel daran, daß Nitrate auch im Dunkeln assimiliert werden können, allerdings war die Verwertung bei Bestrahlung eine bessere. GODLEWSKI faßte daher seine Ergebnisse in dem heute allgemein angenommenen Satze zusammen, daß „das Licht auf die Verarbeitung der Nitrate — begünstigend einwirkt".

3. Die Fähigkeit, Nitrate oder Nitrogruppen zu reduzieren, ist nicht auf die nitratassimilierenden Organismen beschränkt. SCHÖNBEIN[3] beobachtete, daß rote Blutkörperchen Nitrate in Nitrite überführen

---

[1] SCHIMPER, Botan. Ztg. 46, 65. 1888.
[2] GODLEWSKI: Extrait Bull. Acad. Scient. Cracovie, Juin 1903.
[3] SCHÖNBEIN: Journ. f. prakt. Chemie 84, 193. 1861.

Nach NEUBERG und WELDE[1] verwandelt gärende Hefe Nitrobenzol in Anilin: als Zwischenstufen nimmt NEUBERG Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin an, da auch diese Stoffe durch gärende Hefe zu Anilin reduziert werden[2].

Organbreie und zellfreie Flüssigkeiten tierischer oder pflanzlicher Herkunft reagieren vielfach mit Nitratsauerstoff, wobei niedrigere Oxydationsstufen des Stickstoffs entstehen, man spricht in diesem Fall von „Reduktasen" In der SCHARDINGERschen Milchprobe kann das Methylenblau nach BACH[3] durch Nitrat vertreten werden, an Stelle von Methylenweiß bildet sich dann Nitrit

Als Zwischenstufe der Nitratreduktion betrachtet B MOORE[4] salpetrige Säure und vermutet, daß diese in bestrahlten grünen Blättern entsteht; er stützt sich dabei auf die bekannte Tatsache, daß kurzwellige Strahlung Nitrat in Nitrit und Sauerstoff spaltet[5]

4 In nitratassimilierenden Zellen tritt normalerweise die Reduktion der Salpetersäure gegen die Oxydation der Brennstoffe völlig zurück und konnte deshalb nie direkt gemessen werden Durch einen einfachen Kunstgriff gelang es, die Geschwindigkeit der Nitratreduktion so zu steigern, daß sie der Geschwindigkeit der übrigen Zellvorgänge gleichkam oder diese sogar übertraf. Als Versuchsobjekt diente eine kleine isoliert wachsende Grünalge, Chlorella pyrenoidea Chick aus dem Formenkreis der Chlorella vulgaris Beyerink[6] Bringt man diese Alge in konzentriertere Nitratlösungen oder in Lösungen verdünnter freier Salpetersäure, so beobachtet man keine oder nur eine unbedeutende Beschleunigung der Nitratreduktion Da undissoziierte Säuremoleküle im Gegensatz zu Salzen und Ionen vielfach schnell in lebende Zellen eindringen, lag es nahe, weitere Versuche mit höheren Konzentrationen an undissoziierter Salpetersäure anzustellen, also mit Gemischen von Salpetersäure und Nitrat Wurde die Alge in derartige Gemische eingebracht, so stieg die Geschwindigkeit der Nitratreduktion zu außerordentlich hohen Beträgen an, indem sie im Dunkeln durchschnittlich 70%, bei Bestrahlung 200% des Gesamtstoffwechsels ausmachte, in beiden Fällen mithin ohne Schwierigkeiten direkt gemessen werden

---

[1] NEUBERG u. WELDE, diese Zeitschr **60**, 472. 1914

[2] NEUBERG u. WELDE, diese Zeitschr. **67**, 18. 1914; vgl. auch W. LIPSCHUTZ Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol. Chem **109**, 189. 1920

[3] Diese Zeitschr **31**, 443. 1911; **33**, 282 1911.

[4] MOORE· Proc of the roy soc of London B. **90**, 158 1918.

[5] z. B. WARBURG, E.: Sitzungsber. d. Preuß Akad d. Wiss. Physik.-mathem Klasse 1918, S. 1228.

[6] Herrn Dr v. WETTSTEIN sage ich auch hier für die Bestimmung der Alge vielen Dank

konnte. Hierbei blieb die Alge etwa 10 Stunden unverandert grün und teilungsfähig

Die Wiedergabe der Versuche zerfallt in folgende Abschnitte:

I Versuchsanordnung

II Meßmethoden. Messung des Gaswechsels a) durch Analyse, b) nach der Druckmethode Bestimmung des Ammoniaks. Bestimmung der salpetrigen Saure.

III Extra-Kohlensaure.

IV Ammoniak und Extra-Kohlensaure Die Gleichung der Nitratreduktion Reduktion und Assimilation des Salpetersaure-Stickstoffs

V Trennung der Nitratreduktion von Atmung und Assimilation mittels Blausaure.

VI Thermodynamik der Nitratreduktion

VII Narkose und Nitratreduktion.

VIII Einfluß der Sauerstoffkonzentration Salpetrige Saure und Ammoniak

IX Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung

X Mechanismus der Lichtwirkung

XI Protokolle

I. Versuchsanordnung.

Die Alge wurde wie fruher beschrieben[1] unter Bestrahlung mit einer Metallfadenlampe gezuchtet Die Aussaat betrug etwa 0 1 ccm an frischer Zellsubstanz (entsprechend 20 mg Trockensubstanz) auf 200 ccm KNOPsche Losung Nach 2 Tagen, wenn sich die Zellmenge auf etwa das Vierfache vermehrt hatte wurde das Material fur die Versuche benutzt; altere Kulturen — besonders solche in denen die Algen schon sedimentiert waren — sind fur die Versuche weniger geeignet

Die Kulturflussigkeit wurde zunachst unter mehrmaligem Waschen auf der Zentrifuge durch $\frac{n}{10}$-Natriumnitratlosung ersetzt und eine neutrale Stammsuspension hergestellt die 0 2—0 4 ccm Zellsubstanz auf 10 ccm enthielt Zur Messung der Nitratreduktion wurde 1 Volumen dieser Stammsuspension mit 1 Volumen $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$- $\frac{n}{50}$-HNO_3-Losung vermischt so daß die Zellen dann — bei einer Suspensionsdichte von 0.1—0 2 ccm auf 10 ccm — in einer $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$- $\frac{n}{100}$-HNO_3-Losung suspendiert waren Die Konzentration an undissoziierter Salpetersaure in diesem Gemisch, im folgenden kurz als Nitratgemisch bezeichnet berechnet sich[2] zu ungefahr $6 \cdot 10^{-4}$ Molen pro Liter und ist etwa 9 mal so groß wie in einer $\frac{n}{100}$-HNO_3-Losung ohne Nitratzusatz 10 ccm einer

[1] Diese Zeitschr. 100, 232 1919

[2] BOGDAN: Zeitschr f. Elektrochemie 12, 489. 1916.

derartigen Suspension werden mit Luft oder anderen Gasmischungen einige Zeit geschüttelt und aus den Veranderungen des Gasdrucks, die analytisch oder manometrisch festgestellt wurden, Sauerstoff- und Kohlensaurewechsel berechnet, dann zentrifugiert und in den uberstehenden Flüssigkeiten die Reduktionsprodukte der Salpetersaure bestimmt.

Die Mengen an Stoffen, die hierbei auftraten oder verschwanden, waren von der Größenordnung 10^{-6} bis 10^{-5} Mole. Fur Druckmessungen bedeuten derartige Mengen sehr erhebliche Ausschlage, denken wir uns, daß aus einem Raum von 10 ccm $5 \cdot 10^{-6}$ Mole eines Gases verschwinden, so zeigt ein angeschlossenes Wassermanometer bei Zimmertemperatur eine Druckänderung von rund 100 mm

II. Meß-Methoden.

Messung des Gaswechsels durch Analyse. Wenn auch das fruher beschriebene Druckverfahren[1] einfacher und deshalb zur Auffindung neuer Tatsachen geeigneter ist, so muß die Gasanalyse doch als die Standardmethode betrachtet werden, sie ist unentbehrlich, solange die chemische Natur der im Gaswechsel entstehenden und verschwindenden Stoffe nicht bekannt ist.

Zu den gasanalytischen Versuchen diente ein beiderseitig mit Schwanzhähnen versehener flacher Rezipient (diese Zeitschr **100**, 250, Abb. 7), dessen etwa 20 ccm fassender Rauminhalt zur Halfte mit Zellsuspension gefüllt wurde Bei geoffneten Hahnen in einen Wasserthermostaten versenkt, wurde eine Gasmischung bekannter Zusammensetzung durchgeleitet, bis sich die Flussigkeit mit dieser ins Gleichgewicht gesetzt hatte: dann wurden die Hahne geschlossen und der bei Schluß der Hähne herrschende Atmospharendruck notiert Der Rezipient wurde im Thermostaten (diese Zeitschr **100**, 250, Abb 8) eine passende Zeit, verdunkelt oder bestrahlt, geschuttelt und dann durch Schliff mit dem Meßrohr eines HALDANEschen Analysenapparates verbunden, in dieses wurde ein Teil der im Gasraum enthaltenen Gase ubergefuhrt, wobei eine Entgasung der Flussigkeit leicht vermieden werden konnte Der Prozentgehalt an Sauerstoff und Kohlensäure wurde nach bekannten Methoden ermittelt

Die Berechnung des Gaswechsels gestaltet sich folgendermaßen Es sei

P der Gesamtdruck im Rezipienten bei Beginn des Versuchs in mm Hg,

P' der Gesamtdruck im Rezipienten bei Beendigung des Versuchs in mm Hg,

[1] Diese Zeitschr **100**, 230. 1919.

T	die Thermostatentemperatur in absoluter Zahlung,
p	der Sattigungsdruck des Wasserdampfes bei T Grad in mm Hg,
α_{O_2}	der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs in der Suspensionsflussigkeit bei T Grad,
α_{CO_2}	der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure in der Suspensionsflüssigkeit bei T Grad,
v_F	das Volumen der eingefüllten Zellsuspension in ccm,
v_G	das Volumen des Gasraums in ccm,
$b_{O_2} b_{CO_2} b_{N_2}$	der Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 vor dem Versuch,
$b'_{O_2} b'_{CO_2} b'_{N_2}$	der Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 nach dem Versuch,
x_{O_2}	die entstandene Menge Sauerstoff in ccm (0°, 760 mm Hg),
x_{CO_2}	die entstandene Menge Kohlensaure in ccm (0°, 760 mm Hg).

Dann ist.

$$x_{O_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}\right)\left(\frac{P'-p}{760}\,\frac{b'_{O_2}}{100} - \frac{P-p}{760}\,\frac{b_{O_2}}{100}\right). \tag{2}$$

$$x_{CO_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}\right)\left(\frac{P'-p}{760}\,\frac{b'_{CO_2}}{100} - \frac{P-p}{760}\,\frac{b_{CO_2}}{100}\right) \tag{3}$$

Der Gesamtdruck P' nach dem Versuch laßt sich aus dem Resultat der Gasanalyse in einfacher Weise berechnen Da Stickstoff von der Alge weder gebunden noch entwickelt wird, bleibt der Partialdruck des Stickstoffs wahrend des Versuchs konstant Ergibt die Analyse gleichwohl eine Änderung des Prozentgehalts an Stickstoff so muß sich der Gesamtdruck geandert haben und es gilt

$$(P-p)\frac{b_{N_2}}{100} = (P'-p)\frac{b'_{N_2}}{100}.$$

$$P'-p = (P-p)\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} \tag{4}$$

Aus (4), (3) und (2)

$$x_{O_2} = \left[v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}\right] \frac{P-p}{760 \cdot 100}\left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} b'_{O_2} - b_{O_2}\right). \tag{5}$$

$$x_{CO_2} = \left[v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}\right] \frac{P-p}{760 \cdot 100}\left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} b'_{CO_2} - b_{CO_2}\right) \tag{6}$$

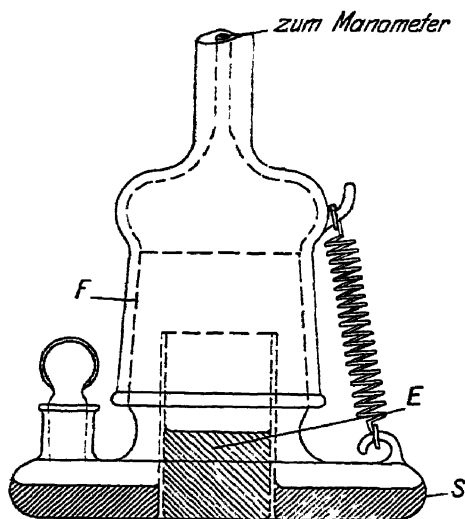
Die eckig eingeklammerten Ausdrücke sind fur verschiedene Versuche konstant, wenn man mit denselben Gas- und Flussigkeitsraumen

und bei derselben Temperatur arbeitet (in den Protokollen als „Gefaß-konstanten" mit K_{O_2} und K_{CO_2} bezeichnet).

Der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs wurde fur 25° in allen Fallen = 0,028 gesetzt, der Absorptionskoeffizient der Kohlensaure bei der gleichen Temperatur = 0,75, wenn die Suspensionsflussigkeit 1/10 molar war, = 0,76, wenn sich die Zellen in der etwa 1/50 molaren KNOPschen Losung befanden[1].

Die in das Meßrohr des Haldane-Apparates ubergeführte Gasmenge betrug im Mittel 7 ccm, die Änderung des Kohlensaure- oder Sauerstoff-gehalts in dieser Gasmenge wahrend eines Versuchs 0,2 ccm, wahrend als Fehler einer Analyse 0,01 ccm = einer halben Einheit der Meßrohrteilung zu betrachten ist. Im Mittel wurde also der Gaswechsel auf 5% bestimmt, d h mit einer fur unsere Zwecke vollig ausreichenden Genauigkeit.

Abb 1

Messung des Gaswechsels nach der Druckmethode. 2 Gefaße, Nr. I und II, wurden mit je 10 ccm Zellsuspension (*S* in der Abb 1) beschickt In den Einsatz (*E*) von Nr I wurde 5 proz Kalilauge gegeben, der Einsatz von Nr II blieb leer. Beide Gefaße wurden darauf durch den Schliff *F* mit HALDANE-BARCROFTschen Blutgasmanometern verbunden und in einem Wasserthermostaten, bestrahlt oder verdunkelt wie fruher (diese Zeitschr **100**, 245, Abb 2) beschrieben, geschuttelt Die Druckmessung geschah bei konstantem Volumen, indem der Meniscus der Sperrflussigkeit vor jeder Ablesung auf dieselbe Marke eingestellt wurde. Die mit den Gefaßen I und II verbundenen Manometer zeigten hierbei verschiedene Druckanderungen, die im ersten Fall, wenn der Gasraum durch Kalilauge frei von Kohlensaure gehalten wird, = der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, im zweiten Fall = der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks — der Änderung des Kohlensaurepartialdrucks sind.

---

[1] Über die Änderung der Absorptionskoeffizienten mit der Salzkonzentration vgl. GEFFKEN, Zeitschr f physikal. Chemie **49**, 257 1904.

Zur Berechnung des Gaswechsels bezeichnen wir mit:

v_F das Volumen der eingefüllten Zellsuspension in ccm,

v_G das Volumen des Gasraums bis zum Ansatz der Manometercapillare in ccm,

v_M das Volumen der Manometercapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit in ccm,

T die Temperatur des Thermostaten in absoluter Zählung,

α_{O_2} den Absorptionskoeffizienten des Sauerstoffs bei T Grad,

α_{CO_2} den Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure bei T Grad,

h_{O_2}, h_{CO_2} die Zunahmen des Sauerstoff- oder Kohlensäurepartialdrucks in mm BRODIEscher Flüssigkeit,

H_I, H_{II} die beobachteten Druckzunahmen für die Gefäße I und II in mm BRODIEscher Flüssigkeit,

x_{O_2}, x_{CO_2} die entstandenen Mengen Sauerstoff und Kohlensäure in cmm (0°, 760 mm)

Für Gefäß I ist:

$$h_{CO_2} = 0, \qquad H_I = h_{O_2},$$

also (vgl. auch diese Zeitschr. **100**, 242 Formel 7)

$$x_{O_2} = H_I \left[\frac{v_G + v_M}{v_F} \cdot \frac{v_G \frac{273}{T} - v_F \alpha_{O_2}}{10} \right]. \tag{7}$$

Für Gefäß II ist, indem wir alle Größen, die sich auf Gefäß II beziehen, mit einem Index versehen

$$x'_{O_2} = \frac{v'_G - v'_M}{v'_G} h'_{O_2} \frac{v'_G \frac{273}{T} - v'_F \alpha_{O_2}}{10} \tag{8}$$

$$x'_{CO_2} = \frac{v'_G - v'_M}{v'_G} h'_{CO_2} \frac{v'_G \frac{273}{T} - v'_F \alpha_{CO_2}}{10} \tag{9}$$

$$H_{II} = h'_{O_2} - h'_{CO_2}. \tag{10}$$

Berücksichtigen wir, daß $x'_{O_2} = x_{O_2}$, da in beiden Gefäßen gleiche Mengen an Sauerstoff verschwinden, so enthalten die drei Gleichungen 8, 9 und 10 noch 3 Unbekannte, aufgelöst nach x_{CO_2} erhalten wir:

$$x'_{CO_2} = H_{II}\left[\frac{v'_G + v_M}{v'_G} - \frac{v'_G\frac{273}{T} - v'_F\,\alpha_{CO_2}}{10}\right] - x_{O_2}\left[\frac{v'_G\frac{273}{T} + v'_F\,\alpha_{CO_2}}{v'_G\frac{273}{T} + v'_F\,\alpha_{O_2}}\right] \tag{11}$$

Arbeitet man mit denselben Flussigkeitsmengen und bei derselben Temperatur, so sind für ein bestimmtes Gefaß die eckig eingeklammerten Ausdrücke konstante Großen (in den Protokollen als „Gefäßkonstanten" bezeichnet, und zwar bei Rechnung nach Gleichung (11) der Faktor für H_{II} mit „Gefaßkonstante 1", der Faktor fur x_{O_2} mit „Gefaßkonstante 2"), die man sich notiert. Die Berechnung des Sauerstoff- und Kohlensäurewechsels ist dann außerordentlich einfach Voraussetzung der Methode ist, daß außer Sauerstoff und Kohlensaure Gase weder entstehen noch verschwinden Gasanalysen zeigten, daß diese Voraussetzung zutrifft und daß insbesondere bei der Reduktion der Salpetersäure kein Stickstoff in Freiheit gesetzt wird (Protokolle 15 und 34)

Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode Zur Kontrolle der Druckmethode wurde der Gaswechsel gruner Zellen unter verschiedenen Bedingungen gleichzeitig nach beiden Verfahren gemessen, wobei gut übereinstimmende Werte gefunden wurden Als Beispiel fuhren wir zwei Versuche an. Suspensionsflussigkeit war im ersten Fall reines Nitratgemisch, im zweiten Fall Nitratgemisch mit Phenylurethan (Protokolle 1 und 2)

Versuch		Sauerstoff-verbrauch	Kohlensaure-produktion	CO_2/O_2
1	Gasanalyse	0,35 ccm	0,56 ccm	1,6
	Druckmethode	0,36 ccm	0,56 ccm	1,56
2	Gasanalyse	0,37 ccm	0,47 ccm	1,27
	Druckmethode	0,39 ccm	0,50 ccm	1,28

Die großte Differenz zwischen den nach beiden Verfahren erhaltenen Werten betragt hier 6%, wobei zu berücksichtigen ist, daß in dieser Zahl auch die bei der Abmessung der Zellen entstehenden Fehler inbegriffen sind

Messung der Ammoniakausscheidung. 1 ccm Gas (0°,760 mm) ist gleich $45 \cdot 10^{-6}$ Grammolekülen Die Ausschlage bei den Gaswechselmessungen waren von der Großenordnung 0,1 ccm Gas $= 4{,}5 \cdot 10^{-6}$ Grammmoleküle. Da es darauf ankam, die Ammoniakausscheidung in Beziehung zum Gaswechsel zu setzen, so mußten beide Großen in derselben

Zellsuspension bestimmt werden, die zu messenden Ammoniakmengen lagen also in der Größenordnung von Milliontel Grammolekülen.

Zur Bestimmung diente die colorimetrische Methode nach NESSLER. Eine Zellsuspension, deren Gaswechsel gemessen war, wurde aus den Gefäßen (Abb. 1) quantitativ in Zentrifugiergläser übergespült, sofort scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. 10 ccm wurden dann mit 0,5 ccm von NESSLERS Reagens in einem Standzylinder gemischt und derselbe Farbenton in einem zweiten Standzylinder durch Verdünnung einer $^n/_{500}$-Ammonchloridlösung (1 ccm $= 2 \cdot 10^{-6}$ Grammolekule Ammoniak) hergestellt. Ein Teil der Ammoniakbestimmungen wurde nicht direkt, sondern nach Übertreiben des Ammoniaks in eine $^n/_{50}$-HCl-Lösung ausgeführt; hierzu wurde die Flüssigkeit mit 1 g Natriumchlorid und 2 ccm einer normalen Kaliumcarbonatlösung versetzt und das in Freiheit gesetzte Ammoniak bei 25° durch einen kräftigen Luftstrom nach der Vorschrift FOLINS[1] in die Vorlage übergetrieben. Diese kompliziertere Art der Ammoniakbestimmung liefert im allgemeinen dieselben Resultate wie die direkte Bestimmung. Wenn jedoch die Zellen geschädigt werden, wie bei niedrigen Sauerstoffdrucken, so treten Stoffe in die Außenflüssigkeit über, die die NESSLERsche Reaktion stören. In solchen Fällen ist die direkte Bestimmung nicht möglich, die Anwendung des FOLINschen Verfahrens unumgänglich.

Auch die salpetrige Säure wurde colorimetrisch bestimmt und zwar mittels α-Naphthylamin-Sulfanilsäure nach ILOSVAY[2]. Nach Beendigung der Gaswechselmessung wurde sofort scharf zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit, je nach den besonderen Bedingungen, auf das 10- bis 100fache verdünnt und das ILOSVAYsche Reagens hinzugefügt.

III. Extra-Kohlensäure (Dunkelversuche).

Wird die Alge in luftgesättigter KNOPscher Lösung suspendiert, so scheidet sie auf ein Volumen veratmeten Sauerstoffs ein Volumen Kohlensäure aus. An diesem Verhältnis ändert sich im allgemeinen nichts, wenn wir die KNOPsche Lösung durch andere Flüssigkeiten ersetzen (Tabelle 1).

Tabelle 1

Suspensionsflüssigkeit	$CO_2 : O_2$	Nr. des Protokolls
KNOP	1,00	6
$^n/_{10}$-KH_2PO_4	1,03	5
$^n/_{10}$-$NaNO_3$	1,01	3
$^n/_{10}$-Na_2SO_4, $^n/_{100}$-H_2SO_4	1,04	4

[1] Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 161. 1902/03. ABDERHALDENS Biochem. Arbeitsmethoden 7, 715. 1913.

[2] TREADWELL: Quantitat. Analyse 1913, S. 291.

Die Abweichungen von 1 fallen in die Fehlergrenzen der Messungen

Bringen wir die Alge in das Nitratgemisch, so steigt der Sauerstoffverbrauch um etwa 40% an (Protokoll 7). Ein derartiger Anstieg ist nicht auffallend, er wird vielfach in Flussigkeiten beobachtet, die permeierende Substanzen, wie Narkotica, Amine, Fettsauren, Blausäure usw. enthalten (vgl diese Zeitschr **100**, 230, Abschn VII). Bemerkenswert dagegen ist, daß die Kohlensaureproduktion starker wachst als der Sauerstoffverbrauch In dem Nitratgemisch — und von allen untersuchten Flüssigkeiten nur in diesem — steigt der Quotient $CO_2 \cdot O_2$ bedeutend an, im Mittel auf etwa 1,5 (Protokolle 1, 8, 9, 10 und 11). Unter einigen hundert Messungen war der niedrigste Quotient, der gefunden wurde, 1,3, der höchste 2,0, wenn die Zellen jungen Kulturen entstammten

Es läßt sich zeigen, daß in dem Nitratgemisch Kohlensaure zweierlei Herkunft ausgeschieden wird, nämlich erstens Atmungskohlensäure, deren Menge genau dem Sauerstoffverbrauch entspricht, und zweitens Kohlensäure, die bei der Reduktion der Salpetersäure entsteht Die letztere nennen wir Extra-Kohlensaure, ihre Größe ist gegeben durch die Differenz der Ausscheidungen an Gesamtkohlensaure und Atmungskohlensäure

Die Ausscheidung an Extra-CO_2 beginnt sofort, nachdem die Zellen in das Nitratgemisch eingebracht sind, und wird dann allmahlich im Lauf von Stunden geringer (Tabelle 2, nach Protokoll 14)

Tabelle 2

	CO_2 O_2	Extra-CO_2 cmm
1. Stunde	1,6	156
2. Stunde	1,6	139
3. Stunde	1,4	87
4. Stunde	1,3	58
5. Stunde	1,2	27

Betrachten wir als Maß des normalen Stoffwechsels den Sauerstoffverbrauch in KNOPscher Lösung, setzen diesen gleich 1 und vergleichen die verschwindenden und entstehenden Stoffe nach Molen, so ist in dem Nitratgemisch der Sauerstoffverbrauch gleich 1,4, die Ausscheidung an Gesamtkohlensäure gleich 2,1, die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure gleich 0,7, das ist 70% des normalen Stoffwechsels Der Stoffwechsel der Alge erleidet also in dem Nitratgemisch eine tiefgreifende Veränderung, diese wird viele Stunden ohne Schädigung ertragen, die Zelle bleibt unverandert grun und teilungsfahig

IV. Ammoniak und Extra-Kohlensäure (Dunkelversuche).

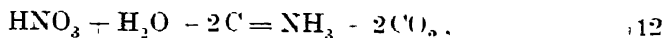
Gleichzeitig mit der Extra-Kohlensäure scheiden die Algen ein Reduktionsprodukt der Salpetersäure aus, Ammoniak. Suspendiert man 30 mg Algen (bezogen auf Trockensubstanz) in 10 ccm Nitratgemisch und schüttelt einige Stunden mit Luft oder Sauerstoff, so findet man die Suspensionsflüssigkeit etwa $^{1}/_{1000}$ normal in bezug auf Ammonnitrat.

Ammoniak und Extra-Kohlensäure erscheinen also zusammen und beide in keiner anderen Flüssigkeit als dem Salpetersäure-Nitratgemisch. Sie sind als Endprodukte eines Vorgangs zu betrachten, in dem die Salpetersäure reduziert wird. Über die relativen Mengen, in denen beide Stoffe ausgeschieden werden, geben Versuche Aufschluß, in denen Ammoniak und Extra-Kohlensäure gleichzeitig für ein und dieselbe Zellsuspension gemessen wurde.

Tabelle 3

Versuch	Zeit	Extra-CO_2 Millionstel Mole	NH_3 Millionstel Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1 (Protokoll 12)	1. Stunde	12	1	0,17
	2. Stunde	11	3	0,55
	3. u. 4. Stde	13	6	0,86
2 (Protokoll 13)	1. Stunde	7,2	1,2	0,33
	2. Stunde	6,8	1,2	0,35
	3. Stunde	4,5	2,4	1,1
3 (Protokoll 14)	1. Stunde	7	0,9	0,26
	2. Stunde	6,3	1,3	0,41
	3. Stunde	3,9	1,8	0,92

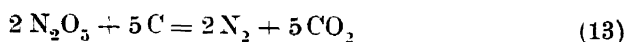
Tabelle 3 zeigt, daß die Ausscheidung an Extra-CO_2 mit der Zeit abnimmt, die Ausscheidung an Ammoniak mit der Zeit zunimmt, bis in der dritten Stunde auf 2 Moleküle Extra-CO_2 etwa 1 Molekül Ammoniak erscheint. In dieser Periode ist der Vorgang folgendermaßen zu formulieren:

$$HNO_3 + H_2O + 2C = NH_3 + 2CO_2, \qquad (12)$$

wobei unter C nicht Kohlenstoff zu verstehen ist, sondern eine organische Verbindung von der Reduktionsstufe des Kohlenstoffs.

Was die früheren Perioden anbetrifft, so fragte es sich, ob anfänglich Ammoniak als solches in der Zelle zurückgehalten wird, etwa durch Adsorption oder Bindung an Säuren. Zur Prüfung wurden die Zellen, nachdem sie einige Stunden in dem Nitratgemisch mit Luft geschüttelt waren, abzentrifugiert und die Sedimente mit $n/2$-Salpetersäure zerstört. Nach Übersättigung mit Kaliumcarbonat wurde dann, der Vorschrift von FOLIN folgend, mit einer Säurevorlage verbunden und bei

25° Luft durchgeblasen. In die Vorlage gingen hierbei nur Spuren von Ammoniak uber Hieraus ist zu schließen, daß in Betracht kommende Mengen von NH_3 oder NH_4^+ in der Zelle nicht zuruckgehalten werden.

Weitere Versuche betrafen die Frage, ob die Reduktion in den ersten Stunden andere Wege gehe und Endprodukte, wie salpetrige Säure, Stickoxydul oder freier Stickstoff auftraten. Salpetrige Saure ließ sich in den von Zellen abgetrennten Zentrifugaten mittels der empfindlichen Diazoreaktion nicht nachweisen Stickoxydul war nach den Gasanalysen auszuschließen denn die Absorption in der Kalilaugepipette war stets nach einmaligem Übertreiben beendigt, wahrend sich die Anwesenheit von Stickoxydul durch eine allmahliche Absorption in der großen Flussigkeitsmenge hatte verraten mussen Um auf Stickstoff zu prüfen, wurde die Nitratreduktion in fast reinem (99,8proz) Sauerstoff vorgenommen; nach 2 Stunden wurde das Gas in den Analysenapparat übergeführt, in dem sich eine bekannte Menge Stickstoff befand Kalilauge und Hydrosulfit absorbierten hierbei das eingefuhrte Gas ebenso vollstandig wie den zum Versuch verwendeten Sauerstoff; der Gasrest hatte also wahrend der Reduktion nicht zugenommen Beispielsweise betrug der Gasrest vor und nach einem Versuch (Protokoll 15) 0,02 ccm, war somit sicher um weniger als 0,01 ccm vermehrt, wahrend 0,25 ccm Stickstoff hatten entstehen müssen, wenn die Reduktion vorwiegend nach der Gleichung

$$2\,N_2O_5 + 5\,C = 2\,N_2 + 5\,CO_2 \qquad (13)$$

verlaufen ware

Es scheint also, daß als einziges Endprodukt der Reduktion Ammoniak von der Zelle abgegeben wird jedoch zunachst in geringeren Mengen, als nach der Produktion an Extra-Kohlensaure zu erwarten ware Die Auffassung liegt nahe, daß das in den ersten Stunden entstehende Ammoniak teilweise von der Zelle zum Aufbau ihrer Leibessubstanz zurückgehalten, d h assimiliert wird und daß erst nachdem die Zelle mit Stickstoff gesattigt ist, alles neugebildete Ammoniak an die Außenflussigkeit abgegeben wird Wir hatten dann zu unterscheiden die Perioden der Assimilation, in der die Salpetersaure reduziert und das Reduktionsprodukt zum Aufbau verwertet wird, und die Periode der reinen Reduktion, in der eine Verwertung nicht mehr stattfindet

Diese Auffassung wird gestutzt durch Versuche mit stickstoffarmen Zellen, die man sich durch Bestrahlung in nitratfreien Losungen verschaffen kann Als stickstofffreie Losungen dienten $n/_{10}$-$NaHCO_3$ oder Knopsche Flüssigkeit, deren Nitrate durch Chloride ersetzt waren In derartigen Losungen kann Kohlensaure tagelang lebhaft assimiliert werden, bei konstanter Stickstoffmenge und wachsendem Gesamtgewicht tritt dann eine Verarmung an Stickstoff ein Als stickstoffreiche

Zellen bezeichnen wir solche, die in einer nitratreichen Flüssigkeit bestrahlt waren.

Um vergleichbares Material an beiden Zellarten zu gewinnen, wurde eine normale Kultur in 2 Teile geteilt, der eine Teil wurde mit einer nitrathaltigen, der andere Teil mit einer nitratfreien Lösung auf der Zentrifuge mehrmals gewaschen, beide Teile wurden unter Durchluftung mit kohlensäurehaltiger Luft etwa 20 Stunden bestrahlt und dann, jeder Teil gesondert, in das Nitratgemisch eingebracht.

Tabelle 4

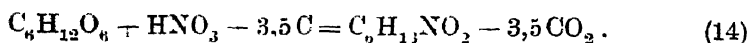
Versuch		CO_2 : O_2	NH_3 Milliontel Mole	Mole NH_3 : 2 Molen Extra-CO_2
1	Stickstoffreiche Zellen .	1,6	2	0,5
(Protokoll 16)	Stickstoffarme Zellen. . .	1,6	0	—
2	Stickstoffreiche Zellen . .	1,8	3,6	0,5
(Protokoll 17)	Stickstoffarme Zellen. .	1,7	0	—

In Tabelle 4 sind die Resultate von 2 Versuchen zusammengestellt, die Versuchszeiten überschritten nicht 2 Stunden, lagen also innerhalb der Periode des „Ammoniakdefizits". Die stickstoffreichen Zellen verhalten sich wie oben beschrieben, mit der Extra-Kohlensäure erscheint reichlich Ammoniak, jedoch weniger als nach Gleichung 12 zu erwarten wäre. Die stickstoffarmen Zellen scheiden relativ zum Sauerstoffverbrauch die gleichen Mengen Extra-Kohlensäure aus, wie die stickstoffreichen Zellen, die Quotienten $CO_2 : O_2$ sind für beide Zellarten nicht sehr verschieden, in bezug auf die Ammoniakausscheidung jedoch ergibt sich ein qualitativer Unterschied: die stickstoffarmen Zellen geben keine nachweisbaren Mengen Ammoniak an die umgebende Flüssigkeit ab.

Das Ammoniakdefizit ist also um so größer, je stickstoffarmer die Zellen sind oder, wie wir auch sagen können, je größer ihr Stickstoffbedarf. Wir schließen daraus auf eine Assimilation des Ammoniaks als Ursache des Defizits und nehmen an, daß in dem Nitratgemisch der Stickstoff der Salpetersäure zunächst nicht nur reduziert, sondern auch assimiliert wird. Ist dieser Schluß richtig, so ergibt sich die Möglichkeit, die Assimilation der Nitrate geradeso wie ihre Reduktion direkt zu messen und ihre Beeinflussung durch Bestrahlung, Narkotica, Blausäure usw. zu untersuchen, ein weites Feld für spätere Versuche.

Im Zusammenhang dieser Arbeit allerdings bedeutet die Assimilation eine unerwünschte Komplikation, nicht nur, weil dabei ein Endprodukt der Reduktion verschwindet und so der Messung entzogen wird, sondern

auch aus folgendem Grunde. Entsteht bei der Assimilation beispielsweise Amidocapronsäure, so können wir, analog Gleichung 12, schreiben:

$$C_6H_{12}O_6 + HNO_3 + 3{,}5\,C = C_6H_{13}NO_2 + 3{,}5\,CO_2\,. \qquad (14)$$

Es bildet sich also pro Mol reduzierter Salpetersäure mehr Extra-Kohlensäure als bei der reinen Reduktion; solange wir die Endprodukte der Assimilation nicht kennen, darf die Menge des reduzierten Nitrats nicht aus der Extra-Kohlensäure berechnet werden. Eine solche Berechnung wird erst in der Periode der reinen Reduktion zulässig, hier entspricht der Bildung von zwei Molekülen Extra-Kohlensäure die Reduktion von einem Molekül Salpetersäure (Gleichung (12)).

V. Trennung der Nitratreduktion von der Atmung und Kohlensäureassimilation mittels Blausäure (Dunkelversuche).

Wie früher beschrieben[1], lassen sich Sauerstoffatmung und Kohlensäureassimilation der Alge mittels Blausäure trennen, und zwar ist die Kohlensäureassimilation von beiden Vorgängen der empfindlichere. Zur Hemmung der Kohlensäureassimilation um 50% ist eine $4 \cdot 10^{-5}$ normale, zur Hemmung der Sauerstoffatmung um den gleichen Betrag eine 10^{-1} normale Blausäurelösung erforderlich.

Ähnlich liegen die Verhältnisse, wenn wir die Algen der gleichzeitigen Wirkung von Salpetersäure und Blausäure aussetzen, indem wir sie in blausäurehaltigen Nitratgemischen suspendieren. Nach Tabelle 5 ist hier zur Hemmung der Kohlensäureassimilation um 20% eine 10^{-5} normale Blausäurelösung erforderlich, zur Hemmung der Sauerstoffatmung um den gleichen Betrag eine 10^{-2} normale Blausäurelösung, d. h. die tausendfache Konzentration.

Tabelle 5

HCN Mole pro Liter	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	Protokoll-Nr.
Hemmung der Sauerstoffatmung . .			1,5%	13%	26%	18
Hemmung d. Kohlensäureassimilation		19%				19

Noch empfindlicher als die Kohlensäureassimilation ist die Nitratreduktion. Eine 10^{-6} normale Blausäurelösung hemmt die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure und Ammoniak um 60—80%, eine 10^{-5} normale Blausäurelösung um etwa 95% (Tabellen 6 und 7). Die Nitratreduktion

[1] Diese Zeitschr. **100**, 264. 1919; **103**, 199. 1920.

Tabelle 6

Versuch	HCN-Mole pro Liter	O_2-Verbrauch cmm	CO_2-Produktion cmm	Extra-CO_2 cmm	Extra-CO_2 10^{-6} Mole	NH_3 10^{-6} Mole
1 (Protokoll 20)	0	228	387	159	7,2	1,8
	10^{-6}	249	314	65	2,9	0,28
	10^{-5}	215	227	12	0,5	0
2 (Protokoll 21)	0	360	637	277	12,6	2,6
	10^{-5}	353	363	10	0,45	0,1

Tabelle 7.

Versuch	HCN-Mole pro Liter	10^{-6}	10^{-5}
1	Hemmung der Ausscheidung an Extra-CO_2 . . .	59%	92%
	Hemmung der Ausscheidung an NH_3	83%	96%
2	Hemmung der Ausscheidung an Extra-CO_2 . .		96%
	Hemmung der Ausscheidung an NH_3 . .		96%

ist somit 20mal empfindlicher als die Kohlensäureassimilation und 20000mal empfindlicher als die Sauerstoffatmung.

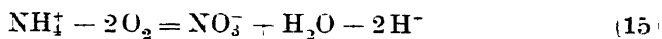
In der Nitratreduktion verbrennt Kohlenstoff durch gebundenen Sauerstoff, in der Atmung verbrennt Kohlenstoff durch freien Sauerstoff. Die Tatsache, daß gleichwohl eine glatte Trennung beider Vorgänge mittels Blausäure möglich ist, zeigt, daß beiden Vorgängen durchaus verschiedene Mechanismen zugrunde liegen.

Theorie[1]. Die spezifische Beeinflussung der Lebensvorgänge durch Blausäure beruht darauf, daß sie Schwermetalle aus einer katalytischen wirksamen Form in katalytisch unwirksame komplexe Cyanide überführt. Blausäure wirkt in sehr kleinen Mengen, weil die in der Zelle wirksamen Schwermetallmengen sehr kleine sind.

Die Richtigkeit dieser Theorie vorausgesetzt, spielen also auch bei der Nitratreduktion, wie bei vielen anderen Lebensvorgängen, Schwermetallspuren eine Rolle.

VI. Thermodynamik der Nitratreduktion.

Oxydieren wir Ammoniak in saurer Lösung zu Salpetersäure, so verläuft der Vorgang nach folgender Gleichung

$$NH_4^+ + 2\,O_2 = NO_3^- + H_2O + 2\,H^+ \tag{15}$$

Bezeichnen wir mit A die maximale Arbeit, die hierbei gewonnen wird, so ist

$$A = RT \ln \frac{NH_4^+ \cdot (p_{O_2})^2}{NO_3^- \,(H^+)^2} - RT \ln K. \tag{16}$$

[1] Zeitschr. f. physiol. Chemie **92**, 231. 1914.

Die Änderungen der freien Energie für die Übergänge der verschiedenen Oxydationsstufen des Stickstoffs ineinander sind vor kurzem von H. Pick[1] berechnet und die hierbei erhaltenen Werte in Form einer Potentialtabelle zusammengestellt. Aus dieser Tabelle ergibt sich für den Übergang $NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$ die Änderung der freien Energie zu $-65\,500$ cal, wenn die Konzentration der gelösten Reaktionsteilnehmer 1 Mol pro Liter, der Druck der gasförmigen Reaktionsteilnehmer 1 Atmosphäre ist. Setzen wir diesen Wert in Gleichung (16) ein, so ist $(T_{absol} = 298^0)$

$$A_{cal} = R\,T \ln \frac{NH_4^+}{NO_3^-} \frac{(p_{O_2})^2}{(H^+)^2} + 65\,500 \qquad (17)$$

Lassen wir die Oxydation in unserem Nitratgemisch unter Schütteln mit Luft vor sich gehen, so ist einzusetzen für

$$p_{O_2} = 0{,}2; \qquad NO_3^- = 10^{-1}; \qquad H^+ = 10^{-2}.$$

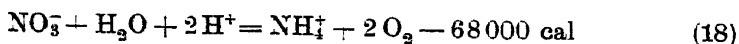
Die NH_4-Konzentration ändert sich während der Oxydation, ihr mittlerer Wert liegt in unserer Anordnung bei $0{,}5 \cdot 10^{-3}$. Legen wir diesen Wert zugrunde, so wird $(T_{absol} = 298^0)$

$$A_{cal} = 2740 + 65\,500 = 68\,240.$$

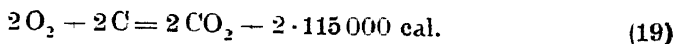
Um also unter unseren Versuchsbedingungen Salpetersäure zu Ammoniak zu reduzieren, müssen rund 68000 cal Arbeit zugeführt werden. Diese Arbeit könnte durch die Sauerstoffatmung geliefert werden, wahrscheinlich war dies von vornherein nicht, da die Atmungsarbeit eine wenn auch noch zumeist unbekannte Bestimmung in der Zelle hat und nicht anzunehmen ist, daß diese Arbeit, wenn die Zellen in das Nitratgemisch eingebracht werden, zu einem großen Teil ihrer früheren Bestimmung entzogen werden kann.

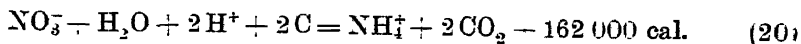
In der Tat wird die zur Reduktion erforderliche Arbeit nicht durch die Sauerstoffatmung geliefert, sondern durch einen mit der Reduktion gekoppelten Vorgang, in welchem Sauerstoff der Salpetersäure und Sauerstoff des Wassers sich mit Kohlenstoff organischer Verbindungen zu Kohlensäure vereinigt.

Um die Änderung der freien Energie für diesen gekoppelten Vorgang zu berechnen, denken wir ihn in zwei Phasen verlaufend. In der ersten Phase bilde sich Sauerstoff von $^1/_5$ Atmosphärendruck nach der Gleichung

$$NO_3^- + H_2O + 2\,H^+ = NH_4^+ + 2\,O_2 - 68\,000 \text{ cal} \qquad (18)$$

[1] Zeitschr. f. Elektrochemie **26**, 182. 1920.

In der zweiten Phase reagiere dieser Sauerstoff mit dem Kohlenstoff eines Kohlenhydrats nach der Gleichung:

$$2\,O_2 + 2\,C = 2\,CO_2 + 2 \cdot 115\,000 \text{ cal.} \qquad (19)$$

Die Zahl 115000 cal ist für $^1/_6$ Mol Traubenzucker nach der Nernstschen Näherungsformel in derselben Weise berechnet, wie der Wert von Pollitzer (98000 cal) für die Verbrennung von amorphem Kohlenstoff. Addieren wir die Gleichungen (18) und (19), so erhalten wir für den Gesamtvorgang

$$NO_3^- + H_2O + 2\,H^+ + 2\,C = NH_4^+ + 2\,CO_2 + 162\,000 \text{ cal.} \qquad (20)$$

Unter den Bedingungen unserer Versuche werden also bei der Nitratreduktion rund 160000 cal Arbeit frei, oder, wie wir auch sagen können, nutzlos entwickelt, während 68000 cal Arbeit in Form chemischer Energie der Zelle erhalten bleiben.

Es berechnet sich so für die Nitratreduktion ein Nutzeffekt von etwa 30%.

VII. Narkose und Nitratreduktion (Dunkelversuche).

Bringt man die Algen in Nitratgemische, denen mittlere Konzentrationen eines Narkoticums zugesetzt sind, so gehen sie in einigen Stunden unter Braunfärbung zugrunde. Werden die braunen Zellen abzentrifugiert, so findet man in den überstehenden Flüssigkeiten reichliche Mengen salpetriger[1] Säure. An Phenylurethan genügt eine Konzentration von 0,026 g in 100 ccm = 1,6 · 10^{-3} Molen pro Liter, um diese Wirkung hervorzubringen, während höhere Konzentrationen in Knopscher Lösung oder Carbonatgemischen unter sonst gleichen Bedingungen[2] unschädlich sind.

Es war deshalb nicht möglich, die Wirkung der Narkotica auf die Nitratreduktion in einem ähnlich weiten Konzentrationsbereich zu prüfen, wie früher[2] die Wirkung auf Atmung oder Kohlensäureassimilation. Immerhin haben Versuche mit Phenylurethan ein bemerkenswertes Resultat ergeben.

Die höchste Konzentration an Phenylurethan, die in mehrstündigen Versuchen ohne Schädigung angewendet werden kann, ist 0,013% = 0,8 · 10^{-3} Mole pro Liter Nitratgemisch. Diese Konzentration hemmt die Kohlensäureassimilation fast völlig, die Bildung an Extra-Kohlensäure jedoch nur um etwa 30%. Wir können uns also mittels Phenylurethan Zellen verschaffen, die zwar Salpetersäure noch lebhaft

---

[1] Vgl. hierzu das folgende Kapitel.

[2] Diese Zeitschr. **100**, 265. 1919 und **103**, 196. 1920.

reduzieren, Kohlensäure jedoch nicht mehr photochemisch zerlegen. Bestrahlungsversuche mit derartigen Zellen waren entscheidend für die Frage, in welcher Weise das Licht die Nitratreduktion beeinflußt (Kapitel X).

Einige Resultate für Zellen in Nitratgemisch ohne Narkoticum und mit 0,013% Narkoticum sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8

Versuch	Lösung	$CO_2 : O_2$	Extra-CO_2 cmm	Hemmung der Ausscheidungen an Extra-CO_2
1	ohne Phenylurethan	1,5	82	33%
(Protokoll 22)	0,013% Phenylurethan	1,3	55	
2	ohne Phenylurethan .	1,5	99	27%
(Protokoll 23)	0,013% Phenylurethan	1,3	72	
3	ohne Phenylurethan .	1,6	210	30%
(Protokoll 24)	0,013% Phenylurethan	1,35	150	

Die Atmung war in allen Fällen etwas beschleunigt. Beschleunigung der Atmung bewirkt, auch wenn die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure unverändert ist, ein Sinken des Quotienten $CO_2 : O_2$; die Änderung dieses Quotienten ist deshalb hier kein Maß für die Hemmung Extra-CO_2-Ausscheidung.

Wird durch eine bestimmte Konzentration Phenylurethan die Atmung beschleunigt, die Nitratreduktion ein wenig gehemmt, die Kohlensäureassimilation völlig gehemmt, so können wir unser Resultat dahin zusammenfassen, daß die Nitratreduktion, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Narkotica, zwischen Atmung und Kohlensäureassimilation steht.

VIII. Einfluß der Sauerstoffkonzentration (Dunkelversuche).

a) In den bisher beschriebenen Versuchen entsprach die Sauerstoffkonzentration der Nitratgemische der Sättigungskonzentration für 1/5 Atmosphäre Sauerstoffdruck, der Gasraum der Schüttelgefäße war mit Luft gefüllt und änderte seine Zusammensetzung während der Versuche nur unwesentlich. Die Zellen blieben hierbei, wie erwähnt, lange Zeit unverändert grün und teilungsfähig.

Füllt man jedoch den Gasraum der Schüttelgefäße mit Mischungen niedrigen Sauerstoffpartialdrucks oder bringt man die Suspensionen in gasdicht verschlossene Zylinder, so werden die Zellen bald hellgrün und schließlich braun. In anderen Flüssigkeiten — der Knopschen

Lösung, einer neutralen Natriumnitratlösung, einer verdünnten Schwefelsäurelösung — wird eine derartige Wirkung des Sauerstoffmangels nicht beobachtet. Freie Salpetersäure zerstört also bei Sauerstoffmangel das Chlorophyll.

Schon bevor die Zellen ihre Farbe ändern, sind sie tot, nicht mehr teilungsfähig und nicht mehr imstande, Kohlensäure zu assimilieren. Der zeitliche Verlauf der Schädigung läßt sich in einfacher Weise verfolgen, indem man Proben ein- und derselben Zellsuspension verschiedene Zeiten dem Sauerstoffmangel aussetzt und dann unter normalen Bedingungen die Maximalgeschwindigkeit der Kohlensäureassimilation mißt. Bei dem in Tabelle 9 wiedergegebenen Versuch wurde die Zerstörung des Chlorophylls nach etwa 2 Stunden sichtbar, während das Assimilationsvermögen schon nach $^1/_2$ Stunde deutlich herabgesetzt, nach $1^1/_2$ Stunden fast völlig verschwunden war.

Tabelle 9 (Protokoll 25).

0,1 ccm Zellen in 10 ccm Nitratgemisch.

	Nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr von			
	0′	30′	60′	90′
Maximale Assimilation in 15′ (cmm zersetzte CO_2)	60	48	18	5

b) Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen erscheint neben Ammoniak ein zweites Reduktionsprodukt der Salpetersäure, die salpetrige Säure. Nitratgemische, in denen Algen kurze Zeit unter Sauerstoffmangel suspendiert waren, geben mit dem Diazoreagens beim Erwärmen tiefrote Färbungen. 0,1 ccm Algen, in 10 ccm Nitratgemisch suspendiert, scheiden hierbei pro Stunde so viel salpetrige Säure aus, daß die umgebende Flüssigkeit in bezug auf HNO_2 10^{-5} bis 10^{-4} normal wird (Protokoll 26).

c) Die giftige Wirkung des Sauerstoffmangels ist nichts anderes als eine Nitritvergiftung. In einem Nitratgemisch, dem 10^{-5} Mole salpetrige Säure pro Liter zugesetzt sind und das mit Luft oder Sauerstoff geschüttelt wird, gehen die Algen unter denselben Erscheinungen, Verblassung und Braunfärbung, zugrunde, wie bei Sauerstoffmangel in anfänglich nitritfreiem Nitratgemisch.

d) Die Nitritbildung wird durch Blausäure nicht gehemmt. Bringt man gleiche Mengen grüner Zellen in gleiche Mengen blausäurehaltiger und blausäurefreier Nitratgemische und beobachtet bei unterbrochener Sauerstoffzufuhr den zeitlichen Verlauf der Verfärbung, so ist kein Unterschied wahrzunehmen. Da die Ammoniakbildung durch Blausäure völlig gehemmt wird (Kapitel V), so ist zu schließen, daß der Reduktion zu Nitrit und der Reduktion zu Ammoniak verschiedene

Mechanismen zugrunde liegen. Offenbar ist nur die Reduktion zu Ammoniak ein physiologischer Vorgang

e) Die Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel ist herabgesetzt (Tabelle 10) um so mehr, je länger der Sauerstoffmangel einwirkt (Versuch 2 der Tabelle) oder je weiter die Nitritvergiftung vorgeschritten ist. Durch Nitrit abgetötete Zellen sind nicht mehr imstande, Salpetersäure zu Ammoniak zu reduzieren, bei der Empfindlichkeit dieses Reduktionsvorganges ein zu erwartendes Resultat

Tabelle 10
0,1 ccm Zellen auf 10 ccm Nitratgemisch.

Versuch	Sauerstoffdruck in Atmosphären	Zeit	Ammoniakausscheidung in Millionlel Molen
1 (Protokoll 27)	0,01	4 Stunden	0,08
	0,21	4 Stunden	3,2
2 (Protokoll 28)	0,01	1. Stunde	0,2
		2. Stunde	0
	0,21	1 Stunde	1,0
		2 Stunde	3,0

Wichtiger ist die Frage, ob Sauerstoffmangel auf die Ammoniakausscheidung schon wirkt, ehe die Zellen durch Nitrit vergiftet sind. Leider läßt sich die Ammoniakausscheidung völlig intakter Zellen, nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, nicht messen, da die Nitritvergiftung schnell einsetzt Immerhin ist der Vergiftungsgrad nach 30 Minuten (vgl Tabelle 9) nur etwa 20%, so daß sich irreversible Folgen der Vergiftung in kurzdauernden Versuchen relativ wenig bemerkbar machen werden

In Tabelle 11 ist das Resultat eines 30 Minuten dauernden Versuchs zusammengestellt, in dem die ausgeschiedenen Mengen an Ammoniak und salpetriger Säure[1] sowie die gleichzeitig veratmeten Sauerstoffmengen gemessen wurden

Tabelle 11 (Protokoll 29)
0,1 ccm Zellen in 10 ccm Nitratgemisch.

Im Gleichgewicht mit Sauerstoff von	Veratmeter O_2 Millionlel Mole	Ausgeschiedenes NH_3 Millionlel Mole	Ausgeschiedene HNO_2 Millionlel Mole
0,01 Atmosphären	1,8	0,34	0,26
0,017 „	2,4	0,46	0,20
0,055 „	4,5	0,9	0,04
0,21 „	4,9	1,0	0

[1] Bei Zimmertemperatur und den niedrigen Konzentrationen an salpetriger Säure und Ammoniak wirken beide Stoffe nicht aufeinander, so daß die ausgeschiedenen Mengen nebeneinander bestimmt werden können.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß sich alle drei Größen in einem Gebiet niedrigen Sauerstoffdrucks erheblich ändern, und zwar wird um so mehr salpetrige Säure, um so weniger Ammoniak ausgeschieden, je geringer der Sauerstoffdruck.

f) *Theorie.* Sinken des Sauerstoffverbrauchs und Bildung von Nitrit sind Erscheinungen, die gleichzeitig bei Verminderung des Sauerstoffdrucks auftreten. Wir schließen daraus, daß ein Sauerstoffatom der Salpetersäure veratmet werden kann wie freier Sauerstoff. Die Veratmung dieses Sauerstoffatoms tritt zurück, wenn die Konzentration an freiem Sauerstoff eine hohe ist; sie wird merklich, wenn der Sauerstoffdruck unter 0,05 Atmosphären sinkt.

Der Einfluß des Sauerstoffdrucks auf die Ammoniakbildung ergibt sich dann aus der einfachen Annahme, daß die in die Zelle eindringende Salpetersäure sofort reduziert wird[1]. Unter solchen Bedingungen ist die Geschwindigkeit der Nitratreduktion bestimmt durch die Menge Salpetersäure, die in einer gegebenen Zeit in die Zelle eindringt, oder die Summe an beiden Reduktionsprodukten, $NH_3 + HNO_2$, ist konstant. Vermindern wir den Sauerstoffdruck, so wird das zweite Glied der konstanten Summe größer, das erste also kleiner.

Bildlich gesprochen gibt es für den Strom der in die Zelle eindringenden Salpetersäure zwei Kanäle, in dem ersten erfolgt Reduktion zu Ammoniak, in dem zweiten zu Nitrit. Sinkt der Sauerstoffdruck, so hebt sich die Schleuse des zweiten Kanals und der Strom in dem ersten wird langsamer.

Für diese Auffassung spricht, daß bei Verminderung des Sauerstoffdrucks die Nitritausscheidung, der Größenordnung nach um den gleichen Betrag steigt, als die Ammoniakausscheidung fällt (Tabelle 11). Eine genauere Übereinstimmung ist nicht zu erwarten, da wir die ausgeschiedenen, nicht die gebildeten Mengen der beiden Reduktionsprodukte messen.

IV. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.

a) *Extra-Sauerstoff.* Die Menge des von der Zelle in einer bestimmten Zeit aufgenommenen oder abgegebenen Sauerstoffs sei x_{O_2}, die Menge der von der Zelle gleichzeitig aufgenommenen oder abgegebe-

[1] Trocknet man die Algen durch Überblasen eines Luftstroms bei Zimmertemperatur und nimmt sie wieder in Knopscher Lösung auf, so sind sie unverändert, was Form und Farbe anbetrifft, doch ist ihre Grenzschicht zerstört, wie man auf vielfache Weise zeigen kann. Bringt man derartige vorbehandelte Algen in das Nitratgemisch und schüttelt mit Sauerstoff, so färben sie sich in etwa 10 Minuten braun. Der Versuch zeigt, daß in dem Nitratgemisch zwischen dem Innern der lebenden Zelle und der umgebenden Flüssigkeit kein Ausgleich der Konzentrationen stattfindet.

nen Kohlensaure x_{CO_2}; Gasaufnahme werde negativ, Gasabgabe positiv gerechnet. Als Extra-Gas bezeichnen wir dann die algebraische Summe des Sauerstoff- und Kohlensaurewechsels, so daß

$$\text{Extra-Gas} = x_{O_2} + x_{CO_2}.$$

Im allgemeinen ist die Menge der abgegebenen Gase nahezu gleich der Menge der aufgenommenen Gase, die Ausscheidung an Extra-Gas also sehr klein. In dem Nitratgemisch ist ohne Bestrahlung, wie wir gesehen haben, die Kohlensaureabgabe großer als die Sauerstoffaufnahme, es wird Extra-Kohlensaure ausgeschieden; von einer bestimmten Intensitat der Bestrahlung an ist die Sauerstoffabgabe größer als die Kohlensäureaufnahme, es wird Extra-Sauerstoff ausgeschieden.

b) Bestrahlen wir Algen unter Ausschluß von Kohlensäure, so wird gleichwohl, solange die Zelle lebt, Sauerstoff ausgeschieden, der aus Bestandteilen der Zelle — chemisch gebundener Kohlensaure oder anderen Stoffen — stammt. Die Geschwindigkeit dieser Sauerstoffproduktion ist in Lösungen von Chloriden, Sulfaten oder Phosphaten sehr klein, sie steigt auf den 15- bis 20fachen Wert, wenn wir die Algen in das Nitratgemisch bringen.

Die Ausscheidung von Extra-Sauerstoff in den Nitratgemischen wird verstandlich auf Grund der Dunkelversuche, nehmen wir an, daß bei Bestrahlung die Dunkelreaktion, in der die Salpetersaure reduziert wird, weitergeht, so muß hier das Extra-Gas in Form von Sauerstoff erscheinen, da Kohlensaure in einer bestrahlten Zelle nicht bestandig ist. Als neue Tatsache jedoch kommt hinzu, daß Extra-Gas und Ammoniak bei Bestrahlung in sehr viel großeren Mengen auftreten als im Dunkeln.

Tabelle 12

Lichtquelle 150 Kerzen in 4 ccm Entfernung

Versuch		Extragas Millliontel Mole	Ammoniak Milliontel Mole	Mole Ammoniak auf 2 Mole Extragas
1 (Protokoll 30)	dunkel	7,2 (CO_2)	1,6	0,44
	hell	20,7 (O_2)	5,6	0,54
2 (Protokoll 31)	dunkel	5,9 (CO_2)	1,4	0,5
	hell	16,7 (O_2)	4,4	0,5
3 (Protokoll 32)	dunkel	5,9 (CO_2)	1,2	0,4
	hell	14,4 (O_2)	2,4	0,33
4 (Protokoll 33)	dunkel	1,4 (CO_2)		
	hell	12,2 (O_2)		

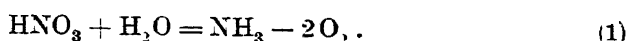
Versuch 1—3 der Tabelle 12 zeigen, in welchem Maß Extra Gas- und Ammoniakausscheidung im allgemeinen durch Bestrahlung beschleu-

nigt werden, es erscheint $2^1/_2$—3mal soviel Extra-Sauerstoff als Extra-Kohlensäure im Dunkeln, und gleichzeitig die 2—3fache Menge an Ammoniak.

Betrachten wir wiederum, wie im ersten Kapitel, als Maß des Gesamtstoffwechsels die Dunkelatmung in KNOPscher Lösung und vergleichen die verschwindenden und entstehenden Gase nach Molen, so beträgt der bei Bestrahlung auftretende Extra-Sauerstoff rund 200% des Gesamtstoffwechsels. Diese tiefgreifende Veränderung der Lebenstätigkeit wird lange Zeit ertragen, ohne daß die Alge zugrunde geht.

Versuch 4 ist mit Zellen einer alten Kultur angestellt, in denen die Dunkelreduktion der Salpetersäure relativ langsam verläuft; hier steigt die Extra-Gasbildung bei Bestrahlung auf das 9fache.

c) Sind die Endprodukte der Nitratreduktion Sauerstoff und Ammoniak, so lautet die Gleichung der Reduktion

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2O_2\,. \qquad (1)$$

Hiernach mußte mit 2 Molen Extra-Sauerstoff 1 Mol Ammoniak erscheinen, während (letzte Spalte der Tabelle 12) nur 0,3—0,5 Mole Ammoniak gefunden werden. Auch wenn man die Ausscheidung beider Stoffe 8 Stunden lang verfolgt, findet man keine Änderung zugunsten der Gleichung (1). Es besteht also, gegenüber dem Extra-Sauerstoff, ein „Ammoniakdefizit", zu dessen Erklärung nach anderen Reduktionsprodukten der Salpetersäure gesucht wurde.

Salpetrige Säure ließ sich mittels der empfindlichen Diazoreaktion nicht nachweisen, Stickoxydul war nach dem Verlauf der Gasanalysen (vgl. Kap. IV) auszuschließen. Auch Stickstoff, der nach Gleichung

$$2N_2O_5 = 2N_2 + 5O_2 \qquad (21)$$

entstehen konnte, bildet sich, wie eingehende Versuche zeigten, nicht; die Gasreste blieben während der Reduktion konstant (Protokoll 34).

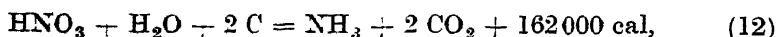
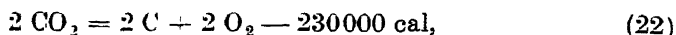
Es scheint demnach, daß andere Reduktionsstufen der Salpetersäure neben Ammoniak nicht auftreten und daß das Ammoniakdefizit auf eine Stickstoffassimilation zurückzuführen ist. Die Reduktion nach Gleichung (1) wäre dann mit anderen Reduktionsvorgängen gekoppelt (Gleichung (14), Kap. IV), die neben der Nitratreduktion Quellen des Extra-Sauerstoffs sein konnten. Ebenso liegen die Verhältnisse anfänglich im Dunkeln, während jedoch hier die Assimilation allmählich gegen die Reduktion zurücktritt, wird bei Bestrahlung offenbar die Koppelung zwischen Assimilation und Reduktion nie gelöst.

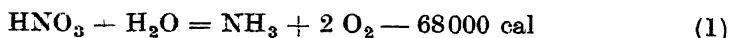
X. Mechanismus der Lichtwirkung.

a) Folgt bei Bestrahlung auf die Dunkelreaktion

$$HNO_3 + H_2O + 2\,C = NH_3 + 2\,CO_2 + 162000 \text{ cal}, \qquad (12)$$

die Reaktion

$$2\,CO_2 = 2\,C + 2\,O_2 - 230000 \text{ cal}, \qquad (22)$$

so fällt die Kohlensäure, wie die Addition beider Gleichungen ergibt, aus der Bilanz heraus und wir erhalten für den Anfangs- und Endzustand

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2 - 68000 \text{ cal} \qquad (1)$$

Hierbei spielt die Kohlensäure als Zwischenkörper eine wichtige Rolle, indem durch ihre Vermittlung die zur Nitratreduktion erforderlichen 68000 cal. Arbeit von der absorbierten Strahlung geleistet werden.

Diese Auffassung erklärt zunächst nur, daß bei Bestrahlung als Endprodukt der Reduktion statt Kohlensäure Sauerstoff erscheint, jedoch nicht, warum mehr Sauerstoff erscheint als Kohlensäure.

Die Frage, in welcher Weise Bestrahlung die Reduktion beschleunigt, konnte durch einen einfachen Versuch beantwortet werden. Bestrahlt man narkotisierte Zellen, in denen die Dunkelreduktion der Salpetersäure nur wenig, die Kohlensäureassimilation fast völlig gehemmt ist[1], so steigt die Ausscheidung an Extra-Gas um einen ähnlichen Betrag wie bei Bestrahlung normaler Zellen, das Extra-Gas in der Narkose ist jedoch kein Sauerstoff, sondern Kohlensäure (Tabelle 13). Es geht daraus hervor, daß Bestrahlung den Vorgang nach Gleichung (12) beschleunigt, und daß zwei durchaus verschiedene Wirkungen der Bestrahlung zu unterscheiden sind, die Kohlensäureassimilation, in der die absorbierte Strahlung Arbeit leistet, und die Beschleunigung eines von selbst verlaufenden Vorgangs.

Tabelle 13
Nitratgemisch, 0,013% Phenylurethan

Versuch		Extra-CO_2 ccm	$\frac{\text{Extra-}CO_2 \text{ hell}}{\text{Extra-}CO_2 \text{ dunkel}}$
1 (Protokoll 35 I)	dunkel hell[2])	0,1 0,23	2,3
2 (Protokoll 35 II)	dunkel hell[2])	0,15 0,28	1,9
3 (Protokoll 36)	dunkel hell[2])	0,09 0,26	2,9

[1] Vgl. Kapitel VII.
[2] 150 Kerzen in 4 cm Entfernung.

b) Liegt der Beschleunigung der Nitratreduktion und der Kohlensaureassimilation derselbe photochemische Primarvorgang zugrunde, so ist zu erwarten, daß wir ahnliche Wirkungen beobachten, wenn wir gleiche Mengen Strahlung absorbieren lassen. Zur Prufung dieser Frage wurden die Geschwindigkeiten der Nitratreduktion und der Kohlensaurereduktion bei verschiedenen Bestrahlungsintensitaten verglichen

Nach früheren Versuchen wird die Wirkung der Bestrahlung auf die Kohlensaurereduktion fur unser Versuchsobjekt bei einigen 100 Meterkerzen (Nitralampe) merklich und wachst bis zu Bestrahlungsintensitaten von einigen 10000 Meterkerzen[1]. In einem Gebiet gleicher Intensitat beginnt und wachst die Wirkung auf die Nitratreduktion, wie Tabelle 14 zeigt.

Tabelle 14.

Versuch	Intensität der Bestrahlung	Extragas	Extragas hell minus Extragas dunkel in ccm = Wirkung der Bestrahlung
1 (Protokoll 30)	dunkel	0,16	
	500 Meterkerzen	0,25	0,09
	uber 20000 Meterkerzen	0,46	0,30
2 (Protokoll 31)	dunkel	0,13	
	500 Meterkerzen	0,22	0,09
	uber 20000 Meterkerzen	0,37	0,24

c) *Theorie* Wird die Geschwindigkeit der Nitratreduktion durch die Menge Salpetersaure bestimmt die in einer gegebenen Zeit in die Zelle eindringt, so kann eine Beschleunigung nur eintreten wenn sich der Aufnahmemechanismus andert In einer derartigen Anderung sehen wir zunachst den wahrscheinlichsten Grund fur die beschleunigende Wirkung der Bestrahlung

XI. Protokolle.

Versuchstemperatur 25 Grad

„*G*" Gasanalytische Methode x_{O_2} nach Gleichung 5, x_{CO_2} nach Gleichung 6 berechnet

„*D*" Druckmethode x_{O_2} nach Gleichung 7 x_{CO_2} nach Gleichung 11 berechnet

„Stickstoff" bei den Luftanalysen bedeutet den Gasrest der Luft also Stickstoff + Edelgase

Nr 1 Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode

Zellmaterial In $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3 Fur Gasanalyse die doppelte Zellkonzentration wie fur Druckmethode

a) *Gasanalyse* In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefullt, bei 25° mit Luft gesättigt Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg

$$v_F = 10; \quad v_G = 11.9; \quad K_{O_2} = 11.3, \quad K_{CO_2} = 18.5$$

[1] Diese Zeitschr. 100, 256 1919

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.. Stickstoff im Apparat 6,16 ccm. Gasvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 12,48 ccm Eingesaugt. 6,32 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge: 12,28 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit: 11,16 ccm CO_2 = 0,20 ccm = 3,16%. O_2 = 1,12 ccm = 17,7%. N_2 = 79,1%

$$x_{O_2} = -0{,}35 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = +0{,}56 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}6$$

b) *Druckmethode* Je 10 ccm Zellensuspension in die Gefäße I und II eingefüllt In I 2 ccm KOH. Gasraum Luft.

Glas I $v_F = 12$; $v_M = 1{,}3$; $v_G = 20{,}7$. Konstante 2,06.

Glas II $v_F = 10$; $v_M = 1{,}3$; $v_G = 18{,}3$. 1 Gefäßkonstante 2,6, 2. Gefäßkonstante 1,42.

Beobachtete Druckänderung in 60 Minuten in Glas I —87 mm; Glas II: — 9 mm

$$x_{O_2} = -179 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = +278 \text{ ccm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}56.$$

c) aus a) und b) auf gleiche Zellmengen berechnet.

	Sauerstoff-verbrauch	Kohlensäure-produktion	$\frac{CO_2}{O_2}$
Gasanalyse . . .	0,35 ccm	0,56 ccm	1,6
Druckmethode .	0,36 ccm	0,56 ccm	1,56

Nr. 2. Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode

Zellmaterial In $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan. Für Gasanalyse die doppelte Zellkonzentration wie für Druckmethode

a) *Gasanalyse* In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt, bei 25° mit Luft gesättigt Barometerstand bei Schluß der Hähne 757 mm Hg

$$v_F = 10, \quad v_G = 10{,}7, \quad K_{O_2} = 10{,}12, \quad K_{CO_2} = 17{,}34$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Apparat 7,12 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 13,13 ccm; eingesaugt 6,01 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,96 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 11,92 ccm CO_2 = 0,17 ccm = 2,83%, O_2 = 1,04 ccm = 17,3% N_2 = 79,9%.

$$x_{O_2} = -0{,}37 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = +0{,}47 \text{ ccm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}27$$

b) *Druckmethode.* Je 10 ccm Zellsuspension in die Gefäße I und II eingefüllt In den Einsatz von I 2 ccm Kalilauge Gasraum Luft

Glas I: $v_F = 12$; $v_M = 1{,}1$; $v_G = 24{,}9$. Gefäßkonstante· 2,42.

Glas II: $v_F = 10$; $v_M = 1{,}2$; $v_G = 28{,}0$. 1 Gefäßkonstante. 3,5. 2 Gefäßkonstante: 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60 Minuten: — 81 mm.
Druckänderung in Glas II nach 60 Minuten: 0 mm.

$$x_{O_2} = -196 \text{ cmm}; \quad x_{CO_2} = -251 \text{ cmm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}28.$$

c) aus a) und b) auf gleiche Zellmengen berechnet

	Sauerstoff-verbrauch	Kohlensäure-produktion	$\frac{CO_2}{O_2}$
Gasanalyse	0,37 ccm	0,47 ccm	1,27
Druckmethode .	0,39 ccm	0,50 ccm	1,28

Nr. 3. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in $^n/_{10}$-$NaNO_3$ (D).

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in die Gefäße I und II eingefüllt, in den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit war eine $^1/_{10}$ normale Natriumnitratlösung. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$, Gefäßkonstante 2,42.
Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 28{,}0$, 1. Gefäßkonstante 3,5. 2. Gefäßkonstante 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60 Min. — 43 mm $x_{O_2} = -104$ cmm
Druckänderung in Glas II nach 60 Min. — 8 mm $x_{CO_2} = -105$ cmm

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{105}{104} = 1.$$

Nr. 4. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Schwefelsäure-Sulfatgemisch (D).

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in die Gefäße I und II eingefüllt, in den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit war eine $^n/_{10}$-Na_2SO_4, $^n/_{100}$-H_2SO_4-Lösung. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$, Gefäßkonstante 2,42.
(Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 28{,}0$, 1. Gefäßkonstante 3,5. 2. Gefäßkonstante 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60 Min. — 42 mm $x_{O_2} = -102$ cmm
Druckänderung in Glas II nach 60 Min. — 7 mm $x_{CO_2} = -106$ cmm

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{106}{102} = 1.$$

Nr. 5. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Kaliumphosphatlösung (G).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-KH_2PO_4-Lösung. Bei 25° Luft durchgeleitet bis zur Sättigung. Barometerstand bei Schluß der Hähne 750 mm Hg.

$$v_F = 10, \quad v_G = 11{,}9, \quad K_{O_2} = 11{,}3, \quad K_{CO_2} = 18{,}5$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten. Stickstoff im Analysenapparat 9,88 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 16,74 ccm. Eingesaugt 6,86 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 16,47 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 15,45 ccm $CO_2 = 0,27$ ccm $= 3,94\%$. $O_2 = 1,02$ ccm $= 14,9\%$. $N_2 = 81,2\%$.

$$x_{O_2} = -0,65 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = +0,67 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1,03.$$

Nr. 6. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ *in* Knop*scher Lösung (G)*

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt Suspensionsflüssigkeit Knopsche Lösung. Bei 25° Luft durchgeleitet bis zur Sättigung Barometerstand bei Schluß der Hähne 750 mm Hg

$$v_F = 10, \quad v_G = 11,9, \quad K_{O_2} = 11,3, \quad K_{CO_2} = 18,5.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,11 ccm. Eingesaugt 7,10 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 13,95 ccm Nach Absorption durch Hydrosulfit 12,71 ccm $CO_2 = 0,16$ ccm $= 2,25\%$ $O_2 =$ 1,24 ccm $= 17,5\%$. $N_2 = 80,3\%$

$$x_{O_2} = -0,38 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = +0,38 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1.$$

Nr 7 Sauerstoffverbrauch in Knopscher Lösung und in dem Nitratgemisch (D)

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in Glas I und II eingefüllt, in die Einsätze beider Gläser 2 ccm Kalilauge, Suspensionsflüssigkeit in Glas I war Knopsche Lösung, in Glas II $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 Gasraum Luft.

Glas I $v_F = 12$, $v_M = 1,1$, $v_G = 23,8$, Gefäßkonstante 2,23.
Glas II $v_F = 12$, $v_M = 1,1$, $v_G = 24,9$, Gefäßkonstante 2,42.

Druckänderung in Glas I nach 60 Min — 65 mm $x_{O_2} = -145$ cmm
Druckänderung in Glas II nach 60 Min — 82 mm $x_{O_2} = -198$ cmm

Resultat: In dem Nitratgemisch wird etwa 40% mehr Sauerstoff verbraucht, als in der Knopschen Lösung

Nr 8. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ *in Nitratgemisch (G)*

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet Barometerstand bei Schluß der Hähne 754 mm Hg

$$v_F = 10,0, \quad v_G = 9,7, \quad K_{O_2} = 9,2, \quad K_{CO_2} = 16,4.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0% CO_2, 20,9% O^2, 79,1% N_2

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Volumen der in den Analysenapparat eingesaugten Gasprobe 5,57 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 5,15 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit 4,48 ccm. CO_2 = 0,42 ccm = 7,54%. O_2 = 0,67 ccm = 12,03%. N_2 = 80,4%.

$$x_{O_2} = -0{,}8 \text{ cmm}, \quad x_{CO_2} = -1{,}16 \text{ ccm}, \quad \text{Extra-}CO_2 = 0{,}36 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}45.$$

Nr. 9 Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (G)

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefullt. Suspensionsflussigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Barometerstand bei Schluß der Hahne 751 mm Hg

$$v_F = 10{,}0, \quad v_G = 9{,}7, \quad K_{O_2} = 9{,}2, \quad K_{CO_2} = 16{,}4$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten Volumen der in den Analysenapparat eingesaugten Gasprobe 7,07 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 6,67 ccm Nach Absorption durch Hydrosulfit 5,65 ccm CO_2 = 0,40 ccm = 5,66% O_2 = 1,02 ccm = 14,4% N_2 = 80,0%.

$$x_{O_2} = -0{,}59 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0{,}88 \text{ ccm}, \quad \text{Extra-}CO_2 = 0{,}29 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}5.$$

Nr. 10. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (G)

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefullt Suspensionsflussigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet Barometerstand bei Schluß der Hahne 761 mm Hg

$$v_F = 10{,}0, \quad v_G = 10{,}7, \quad K_{O_2} = 10{,}1 \quad K_{CO_2} = 17{,}3$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min Stickstoff im Analysenapparat 6,97 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,38 ccm Eingesaugt 6,41 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 13,20 ccm Nach Absorption durch Hydrosulfit 12,07 ccm CO_2 = 0,18 ccm = 2,81% O_2 = 1,13 ccm = 17,6% N_2 = 79,6%

$$x_{O_2} = -0{,}34 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0{,}47 \text{ ccm}, \quad \text{Extra-}CO_2 = 0{,}13 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}4.$$

Nr. 11 Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch D.

Je 10 ccm Zellsuspension in die Gefäße I und II eingefullt, in den Einsatz von Gefäß I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflussigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3

Gefäß I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 24{,}5$. Gefaßkonstante 2,4.
Gefäß II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 25{,}8$. 1. Gefaßkonstante 3,24; 2 Gefaßkonstante 1,3.

Druckänderung in Gefäß I nach 60 Min. — 48 mm. $x_{O_2} = -115$ cmm.
Druckänderung in Gefäß II nach 60 Min. + 10 mm $x_{CO_2} = +182$ cmm.

$$\text{Extra-}CO_2 = 67 \text{ cmm}, \quad \text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{182}{115} = 1{,}6.$$

Nr. 12. Extra-Kohlensaure und Ammoniak.

50 ccm Zellsuspension Suspensionsflussigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Davon je 10 ccm in Glas I und II fur Gaswechselmessung nach Druckmethode, je 10 ccm in drei weitere Gläser fur colorimetrische Ammoniakbestimmung. Gasraum in beiden Fällen Luft. Die Druckanderungen in den Gläsern I und II wurden fortlaufend 4 Stunden lang beobachtet, zur Ammoniakbestimmung wurde nach einer, zwei und vier Stunden der Inhalt je eines Glases in ein Zentrifugierglas ubergespult und im Zentrifugat der Ammoniakgehalt ermittelt.

a) *Gaswechsel (D).* In den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$ Gefaßkonstante 2,06.
Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$ 1. Gefaßkonstante 2,6; 2 Gefaßkonstante 1,42.

Tabelle 15

Zeit	Druckanderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1 Stunde	— 177	+ 45	— 365	+ 635	1,7	270
2 Stunde	— 142	+ 44	— 293	+ 530	1,8	240
3 Stunde	— 125	+ 26	— 258	+ 434	1,7	180
4 Stunde	— 117	+ 15	— 241	+ 381	1,6	140

b) *Ammoniak.* Nach FOLIN in verdunnte Saure ubergetrieben.

Nach 1 Stunde Zentrifugat 10 ccm. Alles ubergetrieben. Gehalt in Vorlage 0,5 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 1 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3

Nach 2 Stunden Zentrifugat auf 20 ccm 10 ccm ubergetrieben Gehalt in Vorlage 1,0 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 2 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3 Gesamtproduktion an NH_3 also $4 \cdot 10^{-6}$ Mole

Nach 4 Stunden Zentrifugat auf 40 ccm 10 ccm ubergetrieben Gehalt in Vorlage 1,25 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 2{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3. Gesamtproduktion an NH_3 also $10 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) *aus a) und b) zusammengestellt* 10 ccm Zellsuspension scheiden aus

Tabelle 16.

Zeit	Extra CO_2 cmm (0°,760 mm)	NH_3 ccm n/1000	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1. Stunde	270	1	$12 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	0,17
2. Stunde	240	3	$11 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	0,55
3. u. 4. Std.	320	6	$14 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	0,86

Nr. 13. Extra-Kohlensäure und Ammoniak.

Gleichzeitige Bestimmung der Ausscheidung an beiden Stoffen in $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3. Anordnung wie in Protokoll 12 beschrieben.

a) *Gaswechsel* (*D*) 1,8 ccm Kalilauge in den Einsatz von Glas I.

Glas I $v_F = 11,8$, $v_M = 1,3$, $v_G = 20,9$. Gefäßkonstante 2,07

Glas II $v_F = 10,0$, $v_M = 1,3$, $v_G = 18,3$ 1. Gefäßkonstante 2,6, 2. Gefäßkonstante 1,42.

Tabelle 17.

Zeit	Druckänderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1. Stunde	— 113	— 25	— 233	— 396	1,7	163
2. Stunde	— 97	— 25	— 201	— 350	1,7	149
3. Stunde	— 86	+ 10	— 178	— 279	1,6	101

b) *Ammoniak.* Bestimmung direkt in den Zentrifugaten, die auf 20 ccm aufgefüllt wurden.

Nach 1 Stunde. 10 ccm = 0,3 ccm $\frac{n}{500}$-NH_3 = 0,6 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 1,2 · 10^{-6} Mole

Nach 2 Stunden. 5 ccm = 0,3 ccm $\frac{n}{500}$-NH_3 = 0,6 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 2,4 · 10^{-6} Mole

Nach 3 Stunden. 5 ccm = 0,6 ccm $\frac{n}{500}$-NH_3 1,2 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 4,8 10^{-6} Mole

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt* 10 ccm Zellsuspension scheiden aus

Tabelle 18

Zeit	Extra-CO_2 cmm (0°,760 mm)	NH_3 ccm $\frac{n}{1000}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1 Stunde	163	1,2	7,2 10^{-6}	1,2 10^{-6}	0,33
2 Stunde	149	1,2	6,8 10^{-6}	1,2 10^{-6}	0,35
3 Stunde	101	2,4	4,5 10^{-6}	2,4 10^{-6}	1,1

Nr. 14. Extra-Kohlensäure und Ammoniak.

Bestimmung der Ausscheidung an beiden Stoffen in $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3. Gaswechsel in 5 aufeinanderfolgenden Stunden, Ammoniakausscheidung in 3 aufeinanderfolgenden Stunden. Gasraum bei Beginn des Versuchs nicht Luft, sondern Sauerstoff (mit etwa 3% Stickstoff). Im übrigen Anordnung wie in Protokoll 12 beschrieben.

a) *Gaswechsel* (*D*). 1,8 ccm Kalilauge in den Einsatz von Glas I.

Glas I $v_F = 11,8$, $v_M = 1,3$, $v_G = 20,9$ Gefäßkonstante 2,07.

Glas II: $v_F = 10,0$, $v_M = 1,3$, $v_G = 18,3$ 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Tabelle 19.

Zeit	Druckänderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1. Stunde	— 122	— 19	— 253	+ 409	1,6	156
2. Stunde	— 109	— 17	— 226	+ 365	1,6	139
3. Stunde	— 97	— 1	— 201	+ 288	1,4	87
4. Stunde	— 91	— 8	— 188	+ 246	1,3	58
5. Stunde	— 73	— 14	— 151	+ 178	1,2	27

b) *Ammoniak*. Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten.

Nach 1 Stunde 10 ccm = 0,22 ccm $n/500$-NH_3 = $0,44 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $0,88 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 2 Stunden 10 ccm = 0,55 ccm $n/500$-NH_3 = $1,1 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2,2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 3 Stunden 10 ccm = 1,0 ccm $n/500$-NH_3 = $2,0 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt*. 10 cm Zellsuspension scheiden aus:

Tabelle 20

Zeit	Extra-CO_2 cmm (0°, 760 mm)	NH_3 ccm $n/1000$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1. Stunde	156	0,9	$7 \cdot 10^{-6}$	$0,9 \cdot 10^{-6}$	0,26
2. Stunde	139	1,3	$6,3 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,41
3. Stunde	87	1,8	$3,9 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,92

Nr. 15. Entsteht bei der Reduktion der Salpetersäure freier Stickstoff?

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $n/10$-$NaNO_3$, $n/100$-HNO_3. 30 Minuten Sauerstoff durchgeleitet. Der Sauerstoff wurde elektrolytisch an einer Eisenelektrode entwickelt, zwischen Elektrolyseur und Rezipient war ein 30 cm langes, mit Kupferoxyd gefülltes glühendes Quarzrohr und eine in fließendem Wasser befindliche Kühlschlange geschaltet.

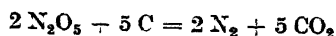
$$v_F = 10, \; v_G = 11,9, \; K_{CO_2} = 18,5$$

Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: Stickstoff im Analysenapparat 6,92 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 15,85 ccm. Eingesaugt 8,93 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge und Hydrosulfit 6,94 ccm. Gasrest in 6,92 ccm: 0,02 ccm.

Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten. Stickstoff im Analysenapparat 6,99 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,16 ccm; eingesaugt 6,17 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,47 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 7,01 ccm; Gasrest in 6,17 ccm 0,02 ccm, d. h. der Gasrest hat während des Versuchs nicht zugenommen. CO_2 = 0,69 ccm = 11,2%. Schätzung der Bildung an Extra-Kohlensäure: Nehmen wir an, der Gesamtdruck habe sich während des Versuchs nicht merklich geändert, so wird in Formel (3) $P' = P$ und x_{CO_2} = 1,9 ccm.

Im Mittel ist CO_2/O_2 in dem Nitratgemisch = 1,5 oder der dritte Teil der gebildeten Kohlensäure ist Extra-Kohlensäure, in unserem Fall 0,63 ccm.

Wurde die Salpetersäure in den ersten Stunden vorwiegend nach der Gleichung

$$2\,N_2O_5 + 5\,C = 2\,N_2 + 5\,CO_2$$

reagieren, so mußten in unserem Fall $^2/_5 \cdot 0{,}63 = 0{,}25$ ccm Stickstoff ausgeschieden werden. Nach der Analyse ist die Stickstoffausscheidung jedenfalls kleiner als 0,01 ccm, ein Zerfall nach obiger Gleichung findet also in merklichem Betrage nicht statt.

Nr. 16. Das Verhältnis NH_3: Extra-CO_2 für N-reiche und N-arme Zellen.

Ungefähr gleiche Teile einer normalen, in Knopscher Lösung gezogenen Algenkultur durch mehrmaliges Waschen auf der Zentrifuge in eine stickstoffhaltige und eine stickstofffreie Lösung übergeführt. Stickstoffhaltige Lösung: Knop. Stickstofffreie Lösung: $n/_{10}$-$NaHCO_3$. Beide Teile 16 Stunden bestrahlt unter Durchleitung von 4% CO_2-Luft. Dann zentrifugiert und, jede Kultur gesondert, in $n/_{10}$-$NaNO_3$, $n/_{100}$-HNO_3 gebracht. Bestimmung des Gaswechsels und der NH_3-Ausscheidung in je 10 ccm. Gasraum Luft. Vergleichbar sind nicht die absoluten Werte, da die Vermehrung und somit die Zellenzahl ungleich war, sondern nur die Verhältniszahlen CO_2/O_2 und NH_3 : Extra-CO_2.

a) *Gaswechsel* (*D*). Je 10 ccm Zellsuspension der normalen Kultur in die Gläser I und II, je 10 ccm der Bicarbonatkultur in die Gläser III und IV. In die Einsätze der Gläser I und III je 2 ccm Kalilauge.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6, 2. Gefäßkonstante 1,42.

Glas III: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06.

Glas IV: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6, 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 60 Min. — 145 mm x_{O_2} — 299 cmm
Druckänderung in Glas II nach 60 Min. — 23 mm x_{CO_2} — 485 cmm
Druckänderung in Glas III nach 60 Min. — 141 mm x_{O_2} — 291 cmm
Druckänderung in Glas IV nach 60 Min. — 16 mm x_{CO_2} — 455 cmm

Normale Kultur: Extra-CO_2 186 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}6$

Bicarbonatkultur: Extra-CO_2 164 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}56$

b) *Ammoniak*. Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten.

Normalkultur: 10 ccm = 0,5 ccm $n/_{500}$-$NH_3 = 1 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3. Gesamt-$NH_3 = 2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Bicarbonatkultur: kein Ammoniak nachweisbar.

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt*.

Tabelle 21

	$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
Normalkultur	1,6	$8{,}6 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	0,47
Bicarbonatkultur	1,6	$7{,}2 \cdot 10^{-6}$	0	0

Nr. 17. Das Verhältnis NH_3: Extra-CO_2 für N-reiche und N-arme Zellen

Ungefähr gleiche Teile einer normalen, in Knopscher Lösung gezogenen Algenkultur durch mehrmaliges Waschen auf der Zentrifuge in eine stickstoffreiche und eine stickstofffreie Lösung übergeführt Stickstoffreiche Lösung Knop, mit Kaliumnitratzusatz bis zu 1°/o. Stickstofffreie Lösung. KNOP, worin die Nitrate durch Chloride ersetzt waren. Beide Teile 24 Stunden bestrahlt unter Durchleitung von 4% CO_2-Luft. Dann zentrifugiert und, jede Kultur gesondert, in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 gebracht. Bestimmung des Gaswechsels und der NH_3-Ausscheidung in je 10 ccm Gasraum Luft Vergleichbar sind nicht die absoluten Werte, da die Vermehrung und somit die Zellenzahl ungleich war, sondern nur die Verhältniszahlen $CO_2 : O_2$ und NH_3 : Extra-CO_2.

a) *Gaswechsel* (*D*) Je 10 ccm Suspension N-reicher Zellen in die Gläser I und II, je 10 ccm Suspension N-armer Zellen in die Gläser III und IV. In die Einsätze der Gläser I und III je 2 ccm Kalilauge.

Glas I. $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06.

Glas II $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Glas III. $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06

Glas IV: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 120 Min · — 193 mm $x_{O_2} = -398$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 120 Min + 64 mm $x_{CO_2} = +731$ cmm
Druckänderung in Glas III nach 120 Min. — 126 mm $x_{O_2} = -260$ cmm.
Druckänderung in Glas IV nach 120 Min. + 24 mm $x_{CO_2} = +432$ cmm

Für N-reiche Zellen: Extra-CO_2 333 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}8$

Für N-arme Zellen: Extra-CO_2 172 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}7$

b) *Ammoniak.* Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten.

N-reiche Zellen· 10 ccm = 0,9 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole Gesamt-NH_3 = $3{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole

N-arme Zellen· kein NH_3 nachweisbar

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt.*

Tabelle 22.

	$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
N-reiche Zellen	1,8	$15 \cdot 10^{-6}$	$3{,}6 \cdot 10^{-6}$	0,48
N-arme Zellen	1,7	$7{,}7 \cdot 10^{-6}$	0	0

Nr. 18. Wirkung der Blausäure auf die Atmung in den Nitratgemischen.

Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure Suspensionsdichte 0,1 ccm Zellen 10 ccm.

Je 10 ccm Zellsuspension in 4 Gefäße der Form Abb. 1, deren Einsatz mit 2 ccm Kalilauge gefüllt war

Tabelle 23.

HCN Mole pro Liter		0	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Im Einsatz KOH	ccm	2	2	2	2
v_F	ccm	12	12	12	12
v_M	ccm	1,1	1,2	0,9	1,1
v_G	ccm	23,8	24,5	23,5	24,9
Gefäßkonstanten		2,3	2,4	2,3	2,4
Druckänderungen nach 60'	mm	— 84	— 79	— 75	— 60
x_{O_2}		— 193	— 190	— 171	— 145
Hemmung d. Atmung	%		1,5	13	26

Nr 19. Wirkung der Blausaure auf die Kohlensaureassimilation in Nitratgemischen.

Suspensionsflussigkeit $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure Suspensionsdichte 0,02 ccm Zellen 10 ccm

Je 8,5 ccm Zellsuspension in 3 Gefäße gleichen Rauminhalts eingefullt (Form vgl. diese Zeitschr **100**, 246, Abb. 3). Gasraum 4% CO_2 in Luft Fur alle 3 Gefäße. $v_F = 8{,}5$, $v_G = 10$ Gefäßkonstante 2,4, berechnet nach dieser Zeitschr **100**, 237, Gleichung 2.

Lichtquelle Metallfadenlampe von 40 Kerzen, in 4 cm Entfernung von den Gefaßen. Meßmethode Anordnung I, diese Zeitschr **100**, 245

Tabelle 24

HCN Mole pro Liter		0	10^{-6}	10^{-5}
Druckanderung nach 45'	mm	— 92	— 94	— 75
Zersetzte CO_2-Mengen	ccm	221	226	180
Hemmung der Assimilation	%		—	19

Nr 20 Wirkung der Blausaure auf die Ausscheidung von Extra-CO_2 und Ammoniak

Suspensionsflussigkeit $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3, ohne und mit Blausaure Von 6 Glasgefaßen wurde je ein Paar mit je 10 ccm Zellsuspension gefullt ein Einsatz jedes Paares außerdem mit 1 ccm Kalilauge Nach Einhangen in den Thermostaten wurden die in 60 Minuten auftretenden Druckanderungen abgelesen Dann wurde der Inhalt je eines Glases gesondert zentrifugiert, die uberstehende Flussigkeit auf 20 ccm aufgefullt und das Ammoniak bestimmt Die colorimetrische Bestimmung des Ammoniaks wird durch HCN-Konzentrationen bis zu 10^{-5} Molen pro Liter nicht beeintrachtigt, so daß es nicht notig war, das Ammoniak nach FOLIN uberzutreiben

a) *Gaswechsel*

Tabelle 25

HCN Mole pro Liter		0		10^{-6}		10^{-5}	
Im Einsatz KOH	ccm	—	1	—	1	—	1
v_F	ccm	10	11	10	11	10	11
v_M	ccm	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
v_G	ccm	18.3	21.7	18.3	21.7	18.3	21.7
Gefaßkonstanten		2,6 1,42	2,15	2,6 1,42	2,15	2,6 1,42	2,15
Druckänderungen nach 30'	mm	— 28	— 106	— 11	— 116	— 30	— 100
x_{O_2} und x_{CO_2}	cmm	— 387	— 228	— 314	— 240	— 227	— 215
Extra-CO_2	cmm	159		65		12	
Extra-CO_2 10^{-6} Mole		7,2		2,9		0.5	

NH_3 in den auf 20 ccm verdünnten Zentrifugaten. Ohne HCN: 10 ccm = 0,45 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,9 · 10^{-6} Mole Sa. 1,8 · 10^{-6} Mole
10^{-6} n HCN: 10 ccm=0,07 ccm $^n/_{500}$-NH_3=0,14 10^{-6} Mole Sa. 0,28 10^{-6} Mole.
10^{-5} n · HCN: kein Ammoniak nachweisbar.

Nr 21. Wirkung der Blausäure auf die Ausscheidung von Extra-CO_2 und Ammoniak.
Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure
Suspensionsdichte · 0,1 ccm Zellen : 10 ccm
Gaswechsel nach der Druckmethode, wie in vorhergehendem Protokoll, Ammoniakbestimmung in den unverdünnten, durch Zentrifugieren von den Zellen abgetrennten Flüssigkeiten
a) *Gaswechsel.* Tabelle 26
b) NH_3
Ohne HCN 10 ccm = 1,3 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 2,6 10^{-6} Mole.
10^{-5} HCN 10 ccm = 0,05 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,1 10^{-6} Mole

Tabelle 26

HCN Mole pro Liter		0		10^{-5}	
Im Einsatz KOH	ccm	—	2	—	2
v_F	ccm	10	12	10	12
v_M	ccm	1,1	1,2	0,9	1,1
v_G	ccm	25,8	24,5	25,5	24,9
Gefäßkonstanten		3,24 1,3	2,4	3,22 1,3	2,42
Druckänderungen nach 120′	mm	+ 52	— 150	— 30	— 146
x_{O_2} und x_{CO_2}	cmm	+ 637	— 360	+ 363	— 353
Extra-CO_2	cmm	277		10	
Extra-CO_2 Millionte! Mole		12,6		0,45	

Nr. 22 Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (D).
Zellsuspension in $^n/_{10}$-$NaNO_3$ vermischt mit gleichen Volumen a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3, b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3, 0,026 % Phenylurethan Es entstand hierbei im Fall a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, im Fall b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013 % Phenylurethan Je 10 ccm von a) wurden in die Gläser I und II, je 10 ccm von b) in die Gläser III und IV eingefüllt, in die Einsätze von I und III je 2 ccm Kalilauge. Gasraum Luft.
Glas I v_F = 12, v_M = 1,2, v_G = 24,5 Gefäßkonstante 2,4
Glas II v_F = 10, v_M = 1,1, v_G = 25,8 1 Gefäßkonstante 3,24; 2 Gefäßkonstante 1,3.
Glas III v_F = 12, v_M = 1,1, v_G = 24,9 Gefäßkonstante 2,42.
Glas IV v_F = 10, v_M = 1,2, v_G = 28,0 1. Gefäßkonstante 3,5; 2 Gefäßkonstante 1,28

Druckänderung in Glas I nach 60 Min — 69 mm x_{O_2} = — 166 cmm Druckänderung in Glas II nach 60 Min. + 10 mm x_{CO_2} = — 248 cmm	ohne Phenylurethan
Druckänderung in Glas III nach 60 Min. — 81 mm x_{O_2} = — 196 cmm Druckänderung in Glas IV nach 60 Min. 0 mm x_{CO_2} = — 251 cmm	mit Phenylurethan

Ohne Phenylurethan: $\frac{CO_2}{O_2} = 1,5$, Extra-$CO_2 = 82$ cmm.

Mit Phenylurethan: $\frac{CO_2}{O_2} = 1,3$, Extra-$CO_2 = 55$ cmm. Hemmung der Extra-CO_2 Bildung $\frac{82 - 55}{82}$ 100 = 33 %.

Nr. 23. Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (D)

Suspensionsflüssigkeit a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013 % Phenylurethan. Herstellung, wie in dem vorhergehenden Protokoll beschrieben. Je 10 ccm von a) wurden in die Gläser I und II, je 10 ccm von b) in die Gläser III und IV eingefüllt, in die Einsätze von I und III je 2 ccm Kalilauge. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1,3$, $v_G = 20,7$ Gefäßkonstante 2,06.
Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1,3$, $v_G = 18,3$ 1 Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42

Glas III $v_F = 12$, $v_M = 1,3$, $v_G = 20,7$ Gefäßkonstante 2,06.
Glas IV $v_F = 10$, $v_M = 1,3$, $v_G = 18,3$ 1 Gefäßkonstante 2,6 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 60 Min. — 103 mm x_{O_2} = — 212 cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60 Min. — 4 mm x_{CO_2} = — 311 cmm
Druckänderung in Glas III nach 60 Min — 122 mm x_{O_2} = — 251 cmm
Druckänderung in Glas IV nach 60 Min. — 13 mm x_{CO_2} = — 323 cmm

Ohne Phenylurethan $\frac{CO_2}{O_2} = 1,5$, Extra-$CO_2 = 99$ cmm.

Mit Phenylurethan. $\frac{CO_2}{O_2} = 1,3$, Extra-$CO_2 = 72$ cmm Hemmung der Extra-CO_2-Bildung $\frac{99 - 72}{99}$ 100 = 27 %.

Nr. 24 Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (G)

Suspensionsflüssigkeit a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013 % Phenylurethan Herstellung wie in Protokoll 22 beschrieben Je 10 ccm in den Rezipienten eingefüllt, für den

$$v_F = 10,\ v_G = 11,9,\ K_{O_2} = 11,3,\ K_{CO_2} = 18,5$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0 % CO_2 20,9 % O_2, 79,1 % N_2

a) *ohne Phenylurethan* Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Minuten Stickstoff im Analysenapparat 6,16 ccm Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 12,48 ccm, eingesaugt 6,32 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,28 ccm, eingesaugt 6,32 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,28 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,16 ccm $CO_2 = 0,20$ ccm = 3,16 % $O_2 = 1,12$ ccm = 17,7 % $N_2 = 79,1$ %.

$x_{O_2} = -0,35$ ccm, $x_{CO_2} = +0,56$ ccm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1,6$, Extra-$CO_2 = 0,21$ ccm.

b) *mit Phenylurethan.* Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 6,38 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,10 ccm, eingesaugt 6,72 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,88 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,73 ccm $CO_2 = 0{,}22$ ccm $= 3{,}27\%$ · $O_2 = 1{,}15$ ccm $= 17{,}1\%$ $N_2 = 79{,}6\%$

$$x_{O_2} = -0{,}43 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0{,}58 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}35, \quad \text{Extra-}CO_2 = 0{,}15 \text{ ccm}$$

c) aus und a) b) Phenylurethan hemmt die Extra-CO_2-Bildung um $\frac{0{,}21 - 0{,}15}{0{,}21} \cdot 100 = 30\%$

Nr. 25. Schädigung durch Sauerstoffmangel.

Suspensionsdichte 0,1 ccm Zellen (= 20 mg Trockensubstanz) auf 10 ccm Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Je 10 ccm unter Luftabschluß bei 25°, vor Licht geschützt. Nach 0, 30, 60 und 90 Min. der Inhalt je eines Zylinders zentrifugiert, das Sediment mit einer Mischung von 85 Teilen $^n/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^n/_{10}$-Na_2CO_3 gewaschen und schließlich so verdünnt, daß auf 8 ccm 0,02 ccm Zellen kamen. Diese in Assimilationsgefäße eingefüllt, für die

$$v_F = 8, \quad v_G = 10{,}5, \quad K = 1$$

und 15 Minuten mit etwa 10000 Lux bestrahlt. Druckänderungen nach 15 Minuten Bestrahlung: − 60 (Exposition 0 Min.); + 46 (Exposition 30 Min.); + 18 (Exposition 60 Min.); + 5 (Exposition 90 Min.). Da $K = 1$, so sind die gleichen Mengen CO_2 (cmm, 0°, 760 mm) zersetzt.

Nr. 26. Bildung von salpetriger Säure bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3

Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen auf 10 ccm.

Vier Glaszylinder von 10 ccm Inhalt wurden mit Zellsuspension gefüllt, durch eingeschliffene Stöpsel unter Vermeidung von Luftblasen verschlossen und in ein vor Licht geschütztes Wasserbad von 25° eingestellt. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Inhalt je eines Zylinders zentrifugiert und in je 0,5 ccm der auf das Doppelte verdünnten überstehenden Flüssigkeit die salpetrige Säure nach Ilosvay bestimmt. Hierzu wurde mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt, 1 ccm Diazoreagenz zugesetzt und einige Zeit auf 80° erwärmt. Zum Vergleich dienten Verdünnungen einer 10^{-5} normalen Kaliumnitritlösung.

Nach 60 Minuten Sauerstoffmangel 0,5 ccm = 1,5 ccm 10^{-5} normal KNO_2. Die auf das doppelte verdünnte überstehende Flüssigkeit war also in bezug auf $HNO_2 = 3 \cdot 10^{-5}$ normal oder die unverdünnte überstehende Flüssigkeit $6 \cdot 10^{-5}$ normal. Da 1 ccm 10^{-5} normale HNO_2-Lösung 10^{-8} Mole HNO_2 enthält, so waren auf 10 ccm, das heißt von 0,1 ccm Zellen, $6 \cdot 10^{-7}$ Mole HNO_2 abgeschieden.

Nach 90, 120 und 150 Minuten Sauerstoffmangel wurde der gleiche Gehalt an HNO_2 gefunden. HNO_2 wird also nur in der ersten Zeit nach Abschluß des Sauerstoffs ausgeschieden.

Die überstehenden Flüssigkeiten färben eine stärkehaltige Jodkaliumlösung blau; die Intensität dieser Reaktion wird im Laufe von Stunden intensiver. Bekanntlich ist die Diazoreaktion, nicht aber die Jodstärkereaktion, eine eindeutige Reaktion auf salpetrige Säure.

Nr. 27. Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflussigkeit $^{n}/_{10}$-$NaNO_3$, $^{n}/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen 10 ccm.

Je 10 ccm a) 4 Stunden mit Luft geschuttelt,

b) 4 Stunden mit 1% Sauerstoff in Stickstoff geschuttelt

Nach dieser Zeit war a) unverändert grun, b) braun Zur Ammoniakbestimmung wurde zentrifugiert und das Ammoniak aus den passend verdunnten uberstehenden Flussigkeiten nach FOLIN ubergetrieben

a) Überstehende Flussigkeit auf 40 ccm. 10 ccm = 0,4 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 = 0,8 10^{-6} Mole Gesamtammoniak 3,2 · 10^{-6} Mole

b) Überstehende Flussigkeit insgesamt = 0,04 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 = 0,08 10^{-6} Mole Gesamtammoniak 0,08 10^{-6} Mole

Nr. 28. Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflussigkeit $^{n}/_{10}$-$NaNO_3$, $^{n}/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte 0,2 ccm Zellen 10 ccm.

Je 20 ccm a) mit Luft, b) mit 1% Sauerstoff in Stickstoff geschuttelt Nach einer und zwei Stunden je 10 ccm von a) und b) zentrifugiert und das Ammoniak nach FOLIN bestimmt.

Gasraum Luft, nach einer Stunde Gesamtmenge der uberstehenden Flussigkeit ubergetrieben In der Vorlage gefunden 0,5 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 = 1,0 · 10^{-6} Mole

Gasraum Luft, nach 2 Stunden die Halfte der uberstehenden Flussigkeit ubergetrieben In der Vorlage gefunden 1,0 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 = 2 10^{-6} Mole Gesamtammoniak 4 10^{-6} Mole

Gasraum 1% Sauerstoff, nach einer Stunde Gesamtmenge der uberstehenden Flussigkeit ubergetrieben In der Vorlage gefunden 0,1 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 0,2 10^{-6} Mole

Gasraum 1% Sauerstoff, nach 2 Stunden Gesamtmenge der uberstehenden Flussigkeit ubergetrieben In der Vorlage gefunden 0,1 ccm $^{n}/_{500}$-NH_3 = 0,2 10^{-6} Mole

Nr 29 Einfluß des Sauerstoffdrucks auf Sauerstoffverbrauch Ammoniak- und Nitritausscheidung

Suspensionsflussigkeit $^{n}/_{10}$-$NaNO_3$, $^{n}/_{100}$-HNO_3

Suspensionsdichte 0,1 ccm Zellen 10 ccm

Je 10 ccm Zellsuspension wurde in 8 Gefaße der Form Abb 1 eingefullt, in die Einsätze von 4 Gefaßen je 2 ccm Kalilauge Die Gefaße wurden zu 4 Paaren so zusammengestellt, daß sich in jedem Paar ein kalilaugefreier und ein kalilaugehaltiger Einsatz befand Je ein Paar wurde mit derselben Gasmischung, Sauerstoff in Stickstoff, gefullt Nach 30 Minuten langem Schutteln im Thermostaten wurden die Druckanderungen abgelesen, dann der Inhalt jedes Gefaßpaares gesondert zentrifugiert und in den uberstehenden Flussigkeiten Ammoniak und salpetrige Säure bestimmt

Gasraume und Zellmengen waren so gewahlt, daß sich der Sauerstoffgehalt der Gasmischungen im Lauf des Versuchs nur unwesentlich anderte

a) *Gaswechsel.*

Tabelle 27

O_2-Druck Atmosphären	0,01		0,017		0,055		0,21	
Im Einsatz KOH ccm	—	2	—	2	—	2	—	2
v_F . . . . . . ccm	10	12	10	12	10	12	10	12
v_M . . . . . . ccm	0,9	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	0,9	1 2
v_G . . . . . . ccm	25,5	24,9	25,8	24,5	25,8	24,5	25,5	24,9
Gefäßkonstanten	3,22 1,3	2,42	3 24 1,3	2,4	3,24 1,3	2,4	3,22 1,3	2,42
Druckänderung in 30'	— 12	— 16	— 11	— 22	+ 18	— 42	— 24	— 45
x_{O_2} und x_{CO_2} cmm	— 89	— 39	— 105	— 53	+ 190	— 101	+ 219	— 109
Extra-CO_2 cmm	50		52		89		110	
Sauerstoffverbrauch 10^{-6} Mole		1,8		2,4		4,5		4,9

b) NH_3 *in 10 ccm der Zentrifugate*

Mit O_2 von 0,01 Atm geschüttelt. 0,17 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0,34 \cdot 10^{-6}$ Mole
Mit O_2 von 0,017 Atm. geschüttelt: 0,23 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0,46 \cdot 10^{-6}$ Mole
Mit O_2 von 0,055 Atm. geschüttelt: 0,45 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0,9 \cdot 10^{-6}$ Mole
Mit O_2 von 0,21 Atm. geschüttelt. 0,5 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mole

c) HNO_2 in der Suspensionsflüssigkeit.

Mit O_2 von 0,01 Atm. geschüttelt 0,5 cm = 1,3 ccm 10^{-5} n-HNO_2 Sa 26 ccm 10^{-5} n-HNO_2 = $26 \cdot 10^{-8}$ Mole
Mit O_2 von 0,017 Atm. geschüttelt 0,5 ccm = 1,0 ccm 10^{-5} n-HNO_2 Sa 20 ccm 10^{-5} n-HNO_2 = $20 \cdot 10^{-8}$ Mole.
Mit O_2 von 0,055 Atm geschüttelt 5 ccm = 0,2 ccm 10^{-5} n-HNO_2 Sa 0,4 ccm 10^{-5} n-HNO_2 = $0,4 \cdot 10^{-8}$ Mole
Mit O_2 von 0,21 Atm geschüttelt keine HNO_2 nachweisbar
Zusammenstellung der Resultate im Text, Tabelle 11

Nr. 30 Extra-Sauerstoff und *Ammoniak bei Bestrahlung*

Suspensionsflüssigkeit. $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3
Suspensionsdichte 0,2 ccm Zellen 10 ccm
Lichtquellen: Metallfadenlampen von 150 Kerzen und von 25 Kerzen
Bestrahlung nach Anordnung IV, Abb 8, diese Zeitschr **100**, 250

Versuchsanordnung: Für je 10 ccm Zellsuspension wurde der Sauerstoff- und Kohlensäurewechsel, ohne Bestrahlung und bei verschiedenen Intensitäten der Bestrahlung, gasanalytisch bestimmt. Nach Entnahme der Gasprobe wurde der Inhalt des Rezipienten sofort zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit auf 20 ccm verdünnt und der Ammoniakgehalt colorimetrisch festgestellt Für jede Messung wurde die Nitratgemisch-Suspension frisch bereitet; als Stammsuspension diente eine bei Zimmertemperatur aufbewahrte Suspension in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, die direkt vor Beginn des Versuchs mit dem gleichen Volumen einer $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3-Lösung gemischt wurde.

a) *Gasanalyse*

Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10,7$, $K_{O_2} = 10,12$, $K_{CO_2} = 17,34$.

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Dunkel. Barometerstand bei Schluß der Hähne 763 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Analysenapparat 0,94 ccm Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,46 ccm, eingesaugt

6,52 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 13,25 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 12,13 ccm. CO_2 = 0,21 ccm = 3,2 %. O_2 = 1,12 ccm = 17,2 %. N_2 = 79,6 %.

$$x_{O_2} = -0{,}38 \text{ ccm}; \; x_{CO_2} = -0{,}54 \text{ ccm}. \quad \text{Extra-}CO_2\text{: } \mathbf{0{,}16} \text{ ccm.}$$

Niedrige Lichtstärke (25 Kerzen, 19 cm vom Rezipienten): Barometerstand bei Schluß der Hähne 763 nm Hg Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Analysenapparat 6,85 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,31 ccm, eingesaugt 6,46 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 13,17 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,91 ccm. CO_2 = 0,14 ccm = 2,17 %. O_2 = 1,26 ccm = 19,5 %. N_2 = 78,3 %.

$$x_{O_2} = -0{,}12 \text{ ccm}. \quad x_{CO_2} = +0{,}37 \text{ ccm}. \quad \text{Extra-}CO_2\text{: } \mathbf{0{,}25} \text{ ccm.}$$

Hohe Lichtstärke (150 Kerzen, 4 cm vom Rezipienten): Barometerstand bei Schluß der Hähne 762 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Analysenapparat 7,05 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,26 ccm, eingesaugt 7,21 ccm Nach Absorption durch Kalilauge 14,26 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 12,5 ccm. CO_2 —. O_2 1,76 ccm = 24,4 %

$$x_{O_2} + 0{,}46 \text{ ccm} \quad x_{CO_2} - \quad \text{Extra-Sauerstoff: } \mathbf{0{,}46} \text{ ccm}$$

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdünnen der überstehenden Flüssigkeit auf 20 ccm.

Dunkel 10 ccm = 0,4 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,8 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 1,6 10^{-6} Mole

Niedrige Lichtstärke 10 ccm = 0,3 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,6 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 1,2 10^{-6} Mole.

Hohe Lichtstärke 5 ccm = 0,7 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 1,4 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 5,6 10^{-6} Mole

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt*

Tabelle 28

10 ccm Zellsuspension scheiden in 60 Min aus

	Extragas ccm	Extragas Milliontel Mole	NH_3 Milliontel Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extragas
Dunkel	0,16 (CO_2)	7,2	1,6	0,44
Niedr Lichtstärke	0,25 (CO_2)	11,2	1,2	0,2
Hohe Lichtstärke	0,46 (O_2)	20,7	5,6	0,54

Nr. 31 Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung

Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.
Suspensionsdichte 0,2 ccm Zellen 10 ccm
Anordnung wie in Protokoll 30

a) *Gasanalyse.* Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0 % Kohlensäure, 20,9 % Sauerstoff, 79,1 % Stickstoff.

Dunkel: Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min. Stickstoff im Analysenapparat

6,97 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,38 ccm; eingesaugt 6,41 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,20 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,07 ccm. $CO_2 = 0,18$ ccm = 2,81 %, $O_2 = 1,13$ ccm = 17,6 %; $N_2 = 79,6$ %.

$$x_{O_2} = -0,34 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0,47 \text{ ccm} \quad \text{Extra-}CO_2 = 0,13 \text{ ccm}.$$

Niedrige Lichtstärke (25 Kerzen, 19 cm). Barometerstand bei Schluß der Hahne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Analysenapparat 6,93 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,44 ccm; eingesaugt 6,51 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,33 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,03 ccm $CO_2 = 0,11$ ccm = 1,7 %, $O_2 = 1,3$ ccm = 20 %. $N_2 = 78,3$ %.

$$x_{O_2} = -0,07 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = + 0,29 \text{ ccm}. \quad \text{Extra-}CO_2 = 0,22 \text{ ccm}.$$

Hohe Lichtstärke (150 Kerzen, 4 cm) Barometerstand bei Schluß der Hahne 761 mm Hg Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min.: Stickstoff im Analysenapparat 6,93 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,61 ccm, eingesaugt 6,68 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,61 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 12,03 ccm. CO_2 — $O_2 = 1,58$ ccm = 23,7 % $N_2 = 76,3$ %.

$$x_{O_2} = -0,37 \text{ ccm}. \quad x_{CO_2} = 0 \quad \text{Extra-Sauerstoff} = 0,37 \text{ ccm}$$

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdunnen der uberstehenden Flussigkeit 20 ccm

Dunkel 10 ccm = 0,35 ccm $n/_{500}$-NH_3 = 0,7 10^{-6} Mole. Gesamt-NH_3 = 1,4 · 10^{-6} Mole.

Niedrige Lichtstarke 10 ccm = 0,33 ccm $n/_{500}$-NH_3 = 0,66 · 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 1,3 10^{-6} Mole

Hohe Lichtstarke. 5 ccm = 0,55 ccm $n/_{500}$-NH_3 = 1,1 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 4,4 10^{-6} Mole.

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt*

Tabelle 29

10 ccm Zellsuspension scheiden in 60 Min aus

	Extragas ccm	Extragas Milliontel Mole	Ammoniak Millionte Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extragas
Dunkel. . . .	0,13 (CO_2)	5,9	1,4	0,5
Niedr Lichtstarke	0,22 (CO_2)	9,9	1,3	0,26
Hohe Lichtstärke .	0,37 (O_2)	16,7	4,4	0,5

Nr. 32. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung

Suspensionsflussigkeit $n/_{10}$-$NaNO_3$, $n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte 0,2 ccm Zellen 10 ccm

Zur Bestimmung 8 ccm Zellsuspension, im ubrigen Anordnung wie in Protokoll 30

a) *Gasanalyse* Rezipient $v_F = 8$, $v_G = 6,9$. $K_{O_2} = 6,57$, $K_{CO_2} = 12,35$

Bei 25° bis zur Sattigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0 % Kohlensaure, 20,9 % Sauerstoff, 79,1 % Stickstoff

Dunkel Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min : Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 11,93 ccm; eingesaugt

4,92 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 11,75 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 10,95 ccm. CO_2 = 0,18 ccm = 3,66%. O_2 = 0,8 ccm = 16,3%. N_2 = 80,1%

$$x_{O_2} = -0{,}31 \text{ ccm}; \; x_{CO_2} = +0{,}44 \text{ ccm} \quad \text{Extra-}CO_2 = \mathbf{0{,}13} \text{ ccm}.$$

Hohe Lichtstarke Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 12,23 ccm, eingesaugt 5,22 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,23 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 10,94 ccm CO_2 — O_2 = 1,29 ccm = 24,7%. N_2 = 75,3%.

$$x_{O_2} = +0{,}32 \text{ ccm}. \; x_{CO_2} = —. \quad \text{Extra-Sauerstoff} = \mathbf{0{,}32} \text{ ccm}.$$

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdunnen der uberstehenden Flüssigkeit auf 20 ccm.

Dunkel 10 ccm = 0,3 ccm $\frac{n}{500}$-NH_3 = 0,6 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 1,2 10^{-6} Mole.

Hell· 10 ccm = 0,6 ccm $\frac{n}{500}$-NH_3 = 1,2 · 10^{-6} Mole Gesamt-NH_3 = 2,4 · 10^{-6} Mole.

c) *aus* a) *und* b) *zusammengestellt*

Tabelle 30.

8 ccm Zellsuspension scheiden in 60 Min. aus

	Extragas ccm	Extragas Millionteł Mole	Ammoniak Milliontel Mole	Mole Ammoniak / Mole Extragas
Dunkel .	0,13 (CO_2)	5,9	1,2	0,4
Hohe Lichtstarke	0,32 (O_2)	14,4	2,4	0,33

Nr 33 Extragas bei Bestrahlung alter Zellen

Zellmaterial aus alter Kultur, in der die Zellen sedimentiert waren
Suspensionsflussigkeit $\frac{n}{10}$-$NaNO_3$, $\frac{n}{100}$-HNO_3
Suspensionsdichte 0,2 ccm Zellen 10 ccm

Zur Bestimmung 10 ccm Zellsuspension. Anordnung wie in Protokoll 30 *Gasanalyse* Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$ Bei 25° bis zur Sattigung Luft durchgeleitet Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 0% Kohlensaure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff

Dunkel Barometerstand bei Schluß der Hahne 766 mm Hg Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 90 Min Stickstoff im Analysenapparat 6,72 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,05 ccm, eingesaugt 6,33 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,92 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,78 ccm CO_2 = 0,13 ccm = 2,05%, O_2 = 1,14 ccm = 18,01% N_2 = 79,9%

$$x_{O_2} = -0{,}31 \text{ ccm} \quad x_{CO_2} = +0{,}34 \text{ ccm} \quad \text{Extra-}CO_2 = \mathbf{0{,}03} \text{ ccm}$$

Hell (150 Kerzen, 4 cm) Barometerstand bei Schluß der Hahne 766 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 90 Min Stickstoff im Analysenapparat 7,00 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,55 ccm, eingesaugt 6,55 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,55 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,05 ccm. CO_2 — O_2 = 1,5 ccm = 22,9%

$$x_{O_2} = +0{,}27 \text{ ccm} \cdot x_{CO_2}. — \quad \text{Extra-Sauerstoff} = \mathbf{0{,}27} \text{ ccm}$$

Nr. 34. Bildet sich bei Bestrahlung in dem Nitratgemisch freier Stickstoff?

Suspensionsflüssigkeit: $n/_{10}$-$NaNO_3$, $n/_{100}$-HNO_3.
Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen 10 ccm.

Zunächst wurde für 10 ccm Zellsuspension Gaswechsel und Ammoniakausscheidung bei Bestrahlung bestimmt, indem der Gasraum Luft war. Dieser Versuch ergab das Ammoniakdefizit oder die zu erwartende Menge an freiem Stickstoff. Dann wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt mit dem Unterschied, daß mit elektrolytisch gewonnenem Sauerstoff gesättigt wurde. (Darstellung des Sauerstoffs vgl. Protokoll 15.) Durch den zweiten Versuch wurde festgestellt, ob eine Vermehrung des Gasrestes von der Großenordnung des Ammoniakdefizits auftrat.

a) *Gasanalyse* in Luft. Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$. $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Barometerstand bei Schluß der Hähne 762 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Min. Bestrahlung (150 Kerzen, 4 cm): Stickstoff im Analysenapparat 7,08 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,88 ccm; Eingesaugt 6,80 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,88 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,25 ccm. CO_2. — $O_2 = 1{,}63 = 24{,}0\%$. $N_2 = 76\%$.

$$x_{O_2} = + 0{,}40 \text{ ccm} \quad x_{CO_2} \text{ —}. \quad \text{Extra-Sauerstoff} = 0{,}40 \text{ ccm}$$

b) Ammoniak nach Zentrifugieren in der überstehenden auf 20 ccm verdünnten Flüssigkeit.

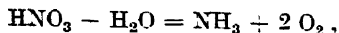
10 ccm = 0,7 ccm $n/_{500}$-NH_3 = $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole.

a') *Gasanalyse* in Sauerstoff.

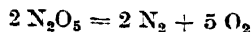
Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° 30 Min. Sauerstoff durchgeleitet. Gasrest in 7 ccm des Sauerstoffs vor dem Versuch 0,02 ccm. Prozentische Zusammensetzung des Gasraums nach 60 Min. Bestrahlung (150 Kerzen, 4 cm): Stickstoff im Analysenapparat 7,02 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,01 ccm; eingesaugt 6,99 ccm; nach Absorption durch Kalilauge und Hydrosulfit 7,04 ccm; Gasrest also 0,02 ccm.

c) *Zusammenfassung.* Mit 0,4 ccm = $18 \cdot 10^{-6}$ Molen Extra-Sauerstoff mußten $9 \cdot 10^{-6}$ Mole Ammoniak erscheinen nach der Gleichung

$$HNO_3 - H_2O = NH_3 + 2\,O_2,$$

während nur $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole, das heißt $\frac{1}{3}$ dieser Menge nachgewiesen wurden.

Wurden 70% des Extra-Sauerstoffs der Reaktion

$$2\,N_2O_5 = 2\,N_2 + 5\,O_2$$

entstammen, so mußten $0{,}4 \cdot \frac{70}{100} \cdot \frac{2}{5} = 0{,}11$ ccm Stickstoff entwickelt werden, während der Gasrest um sicher weniger als 0,01 ccm zunahm.

Nr. 35. Bestrahlung narkotisierter Zellen in Nitratgemisch.

Suspensionsflüssigkeit: $n/_{10}$-$NaNO_3$, $n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan.
Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen 10 ccm.

Eine Stammsuspension in $^{n}/_{10}$-$NaNO_3$ wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und direkt vor Beginn einer Messung mit dem gleichen Volumen $^{n}/_{10}$ $NaNO_3$. $^{n}/_{50}$-HNO_3, 0,026% Phenylurethan vermischt. Je 10 ccm Zellsuspension in den Rezipienten eingefüllt, für den

$$v_F = 10,\ v_G = 10{,}7,\ K_{O_2} = 10{,}12,\ K_{CO_2} = 17{,}34.$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Lichtquelle: ½-Watt-Metallfadenlampe, 150 Kerzen, in 4 cm Entfernung.

Gasanalysen.

Tabelle 31.

		Versuch I[1]		Versuch II[1]	
		dunkel	hell	dunkel	hell
Barometerstand bei Schluß der Hähne	mm Hg	757	757	762	762
Stickstoff i. Analysenappar.	ccm	7,12	6,85	6,89	6,92
Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe	ccm	13,13	13,01	13,42	13,42
Eingesaugt	ccm	6,01	6,16	6,53	6,50
N. Absorption d. Kalilauge	ccm	12,96	12,91	13,20	13,28
N. Absorption d. Hydrosulfit	ccm	11,92	11,66	12,10	11,99
CO_2	ccm	0,17	0,1	0,22	0,14
CO_2	%	2,83	1,62	3,37	2,15
O_2	ccm	1,04	1,25	1,10	1,29
O_2	%	17,3	20,3	16,85	19,85
N_2	%	79,9	78,1	79,8	78,0
x_{CO_2}	ccm	− 0,47	− 0,27	− 0,56	− 0,36
x_{O_2}	ccm	− 0,37	− 0,039	− 0,41	− 0,083
Extra-CO_2	ccm	0,1	0,23	0,15	0,28

Nr. 36. Bestrahlung narkotisierter Zellen in Nitrat- und Sulfatgemisch.

Suspensionsflüssigkeiten:

$^{n}/_{10}$-$NaNO_3$. $^{n}/_{100}$-HNO_3. 0,013% Phenylurethan und $^{n}/_{10}$-Na_2SO_4. $^{n}/_{100}$-H_2SO_4. 0,013% Phenylurethan.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen : 10 ccm.

Darstellung der Suspensionen, wie in Protokoll 35. Je 10 ccm Suspension in den Rezipienten, für den

$$v_F = 10,\ v_G = 10{,}7,\ K_{O_2} = 10{,}12,\ K_{CO_2} = 17{,}34.$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Lichtquelle: ½-Watt-Metallfadenlampe, 150 Kerzen, in 4 cm Entfernung.

---

[1] Für Versuch I und II verschiedenes Zellmaterial.

Gasanalysen:

Tabelle 32.

Gemisch	Nitrat hell	Sulfat hell	Nitrat dunkel
Barometerstand b. Schluß der Hähne . mm Hg	758	757	757
Stickstoff im Analysenapparat . . . . . . ccm	7,07	6,93	7,05
Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe ccm	13,82	13,58	13,60
Eingesaugt . . . . ccm	6,75	6,65	6,55
Nach Absorption durch Kalilauge . . . . ccm	13,70	13,58	13,39
Nach Absorption durch Hydrosulfit. . . . ccm	12,34	12,19	12,30
CO_2 . . . . ccm	0,12	0	0,21
CO_2 . . . . %	1,8		3,2
O_2 . . . . ccm	1,36	1,39	1,09
O_2 . . . . %	20,2	20,9	16,6
N_2 . . . . %	78	79,1	80,2
x_{CO_2} . . . . ccm	+ 0,31	0	+ 0,53
x_{O_2} . . . . ccm	— 0,05	0	— 0,44
Extra-CO_2 . . . . ccm	0,26	0	0,09

Zeitschr. für physikalische Chemie 102 236 1922.

Über den Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation.

Von

Otto Warburg und Erwin Negelein.

Mit 7 Abbildungen

(Mitteilung aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 7. Juni 1922.)

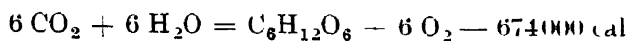
Die vorliegende Abhandlung zerfällt in zwei Teile einen allgemeinen Teil und einen speziellen Teil Der allgemeine Teil enthält die Anordnung und die Ergebnisse der Versuche, der spezielle Teil experimentelle Einzelheiten, Formeln und Protokolle

Allgemeiner Teil.

I.

Die in grünen Pflanzenzellen absorbierte Strahlungsenergie wird im allgemeinen auf dreierlei Art verwandelt in Strahlung anderer Frequenz, im sichtbaren Gebiet als Fluoreszenzstrahlung erscheinend, in Wärme und in chemische Energie

Die Verwandlung in chemische Energie geschieht in dem Vorgang der Kohlensäureassimilation in dem Traubenzucker und Sauerstoff aus Kohlensäure und Wasser entstehen nach der Gleichung

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 - 674000\ \text{cal}$$

worin 674000 cal die Zunahme der Gesamtenergie bedeutet wenn sich der Vorgang von links nach rechts abspielt

Im folgenden soll die Frage behandelt werden welcher Bruchteil der absorbierten Strahlungsenergie bei der Kohlensäureassimilation in chemische Energie verwandelt werden kann, eine oft diskutierte, bisher jedoch nicht beantwortete Frage

Bezeichnen wir die absorbierte Strahlungsenergie mit E, die gleichzeitig geleistete chemische Arbeit — die Zunahme der Gesamtenergie —

mit U, so ist es der Quotient $\frac{U}{E}$, der uns interessiert und zwar $\frac{U}{E}$ unter einer besonderen Bedingung Tragen wir die pro Sekunde absorbierte Strahlungsenergie auf der Abszisse, die pro Sekunde geleistete chemische Arbeit auf der Ordinate auf, so erhalten wir (Abb 1) eine nach der Abszissenachse zu gekrummte Kurve Das Verhaltnis $\frac{U}{E}$ andert sich also mit der Intensitat der absorbierten Strahlung Je intensiver die Strahlung, um so geringer ist der in chemische Energie verwandelte Bruchteil, $\frac{U}{E}$, das mit wachsender Intensitat unbegrenzt kleiner wird, nahert sich mit sinkender Intensitat einem Grenzwert Dieser Grenzwert ist es, dessen Bestimmung wir uns zum Ziel gesetzt haben, die Bestimmung des Energieumsatzes bei sehr kleinen Intensitaten, genauer ausgedruckt des $\lim \frac{dU}{dE}$ für $E = 0$.

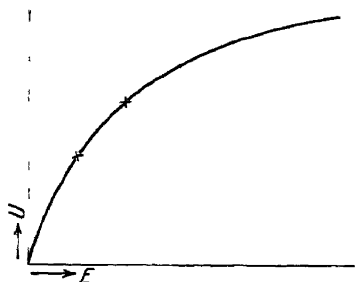



Abb. 1

Verschieden von unserer Frage ist die praktisch wichtige Frage, wieviel nutzbare chemische Energie in der Natur aus dem absorbierten Tageslicht gewonnen wird, ein Problem, das nicht durch Laboratoriumsversuche gelost werden kann und das in jeder Hinsicht anders angefaßt werden muß, als unser Problem

Die Versuche wurden in dem Laboratorium von Herrn Emil Warburg in der Physikalisch-Technischen Reichsanstalt begonnen, wo wir, insbesondere unterstutzt von Herrn Dr Carl Muller, die bolometrische Strahlungsmessung gelernt haben Wir haben als Versuchsobjekt eine einzellige Grunalge, Chlorella vulgaris, benutzt Wir haben die Größe E unseres Quotienten, die absorbierte Strahlung, mittels eines Flachenbolometers gemessen, die Große U, die geleistete chemische Arbeit, mittels eines Manometers, an dem die bei Bestrahlung entwickelten Sauerstoffmengen abgelesen werden konnten

II.

Sitz des Assimilationsvorgangs in der Pflanzenzelle sind besondere Organe, die Chromatophoren, in denen die assimilatorisch wirksame Strahlung absorbiert wird, und in denen die Endprodukte der Assimilation, Zucker und Sauerstoff, erscheinen Dieses Organ, das in verschiedenartigen Formen auftritt, hat in unserer Alge die Form einer Glocke, die der Wand der runden, im Durchmesser etwa 3 μ starken

Zelle anliegt. Es enthält dasselbe Farbstoffgemisch, das WILLSTAETTER[1] in allen grünen Zellen antraf, das grüne Chlorophyll, das gelbe Caroten und das gelbe Xanthophyll. Die gelben Farbstoffe absorbieren merklich nur im Blau, das Chlorophyll in dem gesamten Bereich des sichtbaren Spektralgebiets, am stärksten im Blau und im Rot, wo zwischen 645 und 670 $\mu\mu$ die bekannte scharfe Chlorophyllbande liegt. Die Absorption in dem unsichtbaren Spektralgebiet ist für uns ohne Interesse, da bisher, mittels einwandfreier Methoden, nur im sichtbaren Gebiet assimilatorische Wirkung beobachtet wurde.

Nach einer bekannten Entdeckung von WILLSTAETTER enthält das Chlorophyll Magnesium. Wird das Magnesium abgespalten, so bleibt ein wenig gefärbter Rest zurück, das WILLSTAETTERsche Phäophytin, das sich mit Metallsalzen wieder leicht zu tiefgefärbten Stoffen vereinigt. In dieser farbvertiefenden Wirkung sehen wir die Bedeutung des Magnesiums für den Assimilationsvorgang. Indem das Magnesium in den organischen Rest eintritt, wird das Absorptionsspektrum breiter und tiefer, es vermehren sich die Anregungsmöglichkeiten.

III.

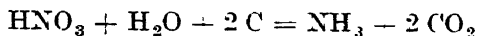
Die Verwandlung von strahlender in chemische Energie in dem Chromatophor ist ein streng spezifischer Vorgang, d. h., absorbierte Strahlungsenergie kann allein zur Reduktion der Kohlensäure, nicht aber zur Reduktion anderer Stoffe verwendet werden.

Die Behauptung, daß allein Kohlensäure photochemisch reduziert werde, scheint zunächst im Widerspruch zu dem zu stehen, was wir beim Wachstum der Alge beobachten. Die Alge wächst, wenn wir sie in einer kohlensäurehaltigen Lösung anorganischer Salze bestrahlen.

Die Substanz, die hierbei entsteht, enthält Wasserstoff, der aus dem Wasser der Nährlösung stammt, z. B. in den CH_2-Gruppen der Fettsäuren, und Stickstoff, der aus dem Nitrat der Nährlösung stammt, z. B. in den Amidogruppen des Eiweißmoleküls. Es muß also neben Kohlensäure auch Wasser und Nitrat reduziert werden, und in der Tat findet man[2], wenn man unter Ausschluß von Kohlensäure bestrahlt, eine langsame Entwicklung von Sauerstoff aus Wasser und Nitrat.

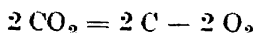
Indessen läßt sich zeigen, daß sich Vorgänge dieser Art unter Vermittlung der Kohlensäure abspielen. Betrachten wir beispielsweise die Bildung von Amidostickstoff, so haben wir zunächst die Dunkelreaktion

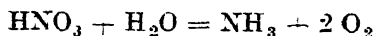
$$HNO_3 + H_2O + 2\,C = NH_3 + 2\,CO_2$$

---

[1] WILLSTAETTER u. STOLL: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913.

[2] WARBURG, O. u. E. NEGELEIN: Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. Biochem. Zeitschr. 110, 66. 1920.

(C fur $^1/_6$ Molekül Traubenzucker) und darauf folgend die photochemische Reaktion

$$2\,CO_2 = 2\,C + 2\,O_2$$

Addieren wir beide Gleichungen, so fallt die Kohlensaure aus der Bilanz heraus, wir erhalten

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2$$

und wir haben scheinbar eine photochemische Reduktion von Wasser und Salpetersaure

Derartige Vorgange bewirken — und darauf kommt es hier an — daß eine bestrahlte Zelle an die Umgebung mehr Sauerstoff abgibt als sie Kohlensaure aus der Umgebung aufnimmt Die Verhaltnisse liegen in unserem Fall so, daß die Alge 10 Molekule Sauerstoff abgibt, wahrend sie gleichzeitig nur 9 Molekule Kohlensaure aufnimmt. Von diesen 10 Molekülen Sauerstoff stammen also 9 aus von außen aufgenommener Kohlensaure, 1 Molekul aus innerhalb der Zelle gebildeter Kohlensaure.

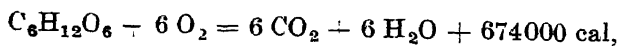
Es ist notwendig, daß in bezug auf diese Verhaltnisse Klarheit herrscht Denn wir haben die chemische Arbeit aus der entwickelten Sauerstoffmenge berechnet unter der Annahme, daß ebensoviele Moleküle Kohlensaure gespalten, als Sauerstoffmolekule entwickelt worden waren.

IV.

Neben der Verwandlung von strahlender in chemische Energie haben wir in der Zelle eine zweite Art von Energieverwandlung, die Verwandlung von chemischer Energie in Warme, auf dem Umweg uber noch nicht naher bekannte Energieformen Wahrend sich die Verwandlung erster Art in einem gesonderten Organ der Zelle bei Bestrahlung abspielt, findet die Verwandlung zweiter Art, die Atmung, in allen Teilen der Zelle und zu jeder Zeit statt

Die Bedeutung der Kohlensaureassimilation fur die organische Welt ist einfach und klar Der Sinn der Atmung ist komplizierter und dunkler Es mag hier die Bemerkung genugen, daß die lebende Zelle ein instabiles, mit merklicher Geschwindigkeit einem Gleichgewichtszustand zustrebendes System ist das nur unter Aufwand von Arbeit erhalten werden kann Das energetische Äquivalent dieser Arbeit ist die in der Atmung verbrauchte chemische Energie

Die Gleichung der Atmung in unserem Fall lautet

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 674000\text{ cal},$$

ein in der Bilanz der Kohlensaureassimilation genau entgegengesetzter Vorgang Da es in keiner Weise gelingt, beide Vorgange so zu trennen,

daß nur die Assimilation übrig bleibt, so haben wir es bei unseren Versuchen immer mit beiden Vorgängen zu tun und eine Messung der Assimilation setzt die Kenntnis der Atmung voraus. Es ergibt sich so die Anordnung eines Assimilationsversuchs. Wir messen zunächst die Atmung getrennt von der Assimilation, d. h., den Sauerstoffverbrauch im Dunkeln, darauf den Sauerstoffwechsel bei Bestrahlung. Aus der Kombination beider Messungen, die auf gleiche Zeiten bezogen werden, finden wir die durch Bestrahlung entwickelte Sauerstoffmenge.

Bei diesem Verfahren wird vorausgesetzt, daß die Atmung während der Bestrahlung ebenso groß ist, wie vor der Bestrahlung im Dunkeln, eine Voraussetzung, die aus folgendem Grund nicht korrekt ist. Bringen wir in die anorganische Lösung, in der unsere Algen suspendiert sind, Traubenzucker, so dringt er in die Zelle ein und bewirkt hier, indem er die Konzentration an verbrennlicher Substanz vermehrt, einen Anstieg der Atmung. Bestrahlen wir, so bildet sich in dem Chromatophor Zucker, der alsbald in die Zelle hineindiffundiert und hier, wie der von außen eingeführte Zucker, die Atmung beschleunigt. Man kann diese Wirkung der Bestrahlung auf die Atmung leicht nachweisen, indem man einige Zeit im Dunkeln gehaltene Zellen bestrahlt und dann wieder verdunkelt. Man findet dann, daß die Atmung nach der Bestrahlung größer ist, als sie vorher im Dunkeln war, und daß sie im Dunkeln allmählich wieder absinkt.

Die Atmung wird also während der Bestrahlung größer sein als nach der Bestrahlung, der Zeit, in der wir sie messen. Indem wir aber für die Belichtungszeit eine zu kleine Atmung einsetzen, finden wir die geleistete chemische Arbeit kleiner, als sie tatsächlich ist.

Man kann diesen Fehler nicht ganz beseitigen, aber dadurch wesentlich verkleinern, daß man Bestrahlungs- und Verdunkelungsperioden fortgesetzt in kurzen Abständen folgen läßt. Man schafft so einigermaßen stationäre Verhältnisse in der Zelle; die Zuckerkonzentrationen schwanken weniger als im Lauf langer Perioden.

V.

Als Strahlungsquelle benutzten wir eine Metallfadenlampe mit Stickstoffüllung. Aus der Strahlung dieser Lampe nahmen wir mittels Ferro- und Kupfersulfat Rot und Ultrarot, mit Hilfe von Anilinfarbstoffen Blau und Grün heraus und verwandten im allgemeinen nur den von 570—645 $\mu\mu$ reichenden Spektralbezirk, das ist Gelb und Gelbrot. Nach dem, was wir über die Absorption in dem Chromatophor erfahren haben, ist dies ein Bezirk, in dem von den drei Farbstoffen allein das

Chlorophyll absorbiert, und zwar schwach absorbiert, indem die dunkeln Absorptionsbanden des Chlorophylls außerhalb unseres Spektralbezirks liegen.

Die Strahlung, die mittels eines Regulierwiderstandes auf 1% konstant gehalten wurde, trat in horizontaler Richtung in einen Wasserthermostaten ein (Abb 2) und traf hier auf einen um 45° gegen die Horizontale geneigten Spiegel, der sie senkrecht nach oben reflektierte. In einer genau festgelegten Horizontalebene des Thermostaten befand sich die Blende des Bolometers, durch das die Intensitat der Strahlung in der genannten Ebene gemessen wurde Hierbei bedienten wir uns einer von Emil Warburg[1] angegebenen Schaltung, bei der die in der Brucke auftretende Potentialdifferenz mittels eines zweiten Stromkreises kompensiert, das Galvanometer also nur als Nullinstrument gebraucht wurde Wir eichten das Bolometer mit der Hefnerlampe nach Gerlach[2] und erhielten die gesuchte Intensitat in cal/sec/qcm mit einer Genauigkeit von etwa 1%

Abb 2

L = Lampe a = Kuvette mit fließendem Wasser b = Kuvette mit 20% Ferrosulfat, Schichtdicke 2 cm c = Kuvette mit 12% Kupfersulfat, Schichtdicke 1 cm. d = Küvette mit 0,02% Tartrazin, 0,02% Rose bengale, Schichtdicke 1 cm S = Spiegel T = Versuchstrog M = Manometer E = Exzenterscheibe

War die Intensitat gemessen, so ersetzten wir das Bolometer durch den Assimilationstrog, ein Glasgefaß, dessen Seitenwande außen versilbert und zum Schutz des Silberspiegels verkupfert waren Der Trog war zu 2/3 mit einer Suspension gruner Zellen gefullt Sein nicht versilberter Boden kam genau an die Stelle des Thermostaten, an der sich vorher die Bolometerblende befunden hatte Bei bekannter Grundflache F des Troges und einer Bestrahlungszeit von t Sekunden war somit die in den Trog eingestrahlte Energie JFt cal

Da jede Zelle Licht nicht nur absorbiert, sondern auch bricht, reflektiert und zerstreut, so wird der Strahlengang in der Zellsuspension ungeordnet und das diffus austretende Licht kann nicht gemessen

---

[1] Warburg, E., G. Leithauser, E. Hupka, C. Muller · Über die Konstante c des Wien-Planckschen Strahlungsgesetzes Ann d Physik, 4. Folge, 40, 609. 1913.

[2] Gerlach, W . Phys. Zeitschr 14, 577. 1903

werden. Die Schwierigkeit, die sich so der Absorptionsmessung entgegenstellte, haben wir umgangen, indem wir mit vollständiger Absorption arbeiteten, d. h., wir füllten eine so dichte Zellsuspension in den Trog ein, daß die gesamte eingestrahlte Energie absorbiert wurde. Der Beweis vollständiger Absorption wurde auf zwei Arten erbracht. Erstens hatte eine Vermehrung der Zelldichte keine Vermehrung der photochemischen Wirkung zur Folge, unsere Ausschläge waren unabhängig von der Zelldichte. Zweitens zogen wir den Farbstoff mit Alkohol aus und brachten die klare alkoholische Lösung in der fraglichen Konzentration und Schichtdicke zwischen Bolometer und Lampe. Das Bolometer zeigte dann keinen Ausschlag, zum Zeichen, daß die Absorption praktisch vollständig war. Wir fanden also die absorbierte Energie, indem wir sie gleich der eingestrahlten setzten.

Bei diesem Verfahren vernachlässigten wir die Lichtmengen, die infolge von Reflexion und Zerstreuung durch den Boden des Troges wieder austraten. Wir haben Grund zu der Annahme, daß diese Mengen relativ klein waren, daß wir also ohne merkliche Fehler eingestrahlte und absorbierte Energie gleichsetzen durften. Trifft diese Annahme nicht zu, so haben wir für die absorbierte Energie einen zu großen Wert eingesetzt, das Verhältnis $\frac{U}{E}$ also kleiner gefunden als es tatsächlich war.

Wird die Strahlung vollständig absorbiert, so sinkt auf dem Weg durch den Trog ihre Intensität von J, der Intensität an der Eintrittsstelle, bis auf einen unmerklich kleinen Wert herab, und wir messen die Assimilation bei Intensitäten, die zwischen J und Null liegen. Denken wir uns den Inhalt des Troges durch horizontale Schnitte in kleine Scheiben von der Höhe dx zerlegt, so nimmt die pro Scheibe absorbierte Lichtmenge — mithin auch die photochemische Wirkung — von unten nach oben ab, während die Atmung in den Scheiben verschiedener Höhe nahezu gleich ist. Wir haben also in dem Trog ein veränderliches Verhältnis von Assimilation zu Atmung, in den untersten Schichten überwiegt die Assimilation, in den obersten die Atmung. Die Assimilation in dem ganzen Trog ist gleich der Summe der Assimilation in den einzelnen Scheiben, und das entsprechende gilt von der Atmung in dem ganzen Trog.

Was wir messen, sind diese Summen, und es ist aus methodischen Gründen wünschenswert, daß das Verhältnis der Summen

$$\frac{\text{Assimilation im ganzen Trog}}{\text{Atmung im ganzen Trog}}$$

nicht zu klein ist. Die Intensität der Strahlung an der Eintrittsstelle muß deshalb, wie eine einfache Rechnung lehrt, relativ hoch sein

Andererseits interessiert uns, wenn wir uns an unsere Aufgabe erinnern, allein die Assimilation bei niedrigen Intensitaten Auf Grund dieser Überlegungen wird man einen Mittelweg einschlagen und die Intensitat an der Eintrittsstelle so wahlen, daß die Assimilation neben der Atmung noch mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden kann

Dieser Bedingung genugt eine Intensität von $0{,}2 \times 10^{-4}$ bis $0{,}4 \times 10^{-4}$ cal sek qcm, das ist etwa der 1000 Teil der Intensitat der Sonnenstrahlung auf der Erdoberflache Bestrahlten wir mit diesen Intensitaten, so betrug die Assimilation in den untersten Schichten des Troges das funf- bis zehnfache der Atmung, die Assimilation in dem ganzen Trog $^1/_2$ bis $^1/_1$ der Atmung in dem ganzen Trog Hierbei waren die Intensitaten hinreichend klein, und wir konnten, wenn wir zwei Messungen bei zwei verschiedenen Intensitaten machten, die Werte für die Intensitat Null durch Interpolation finden

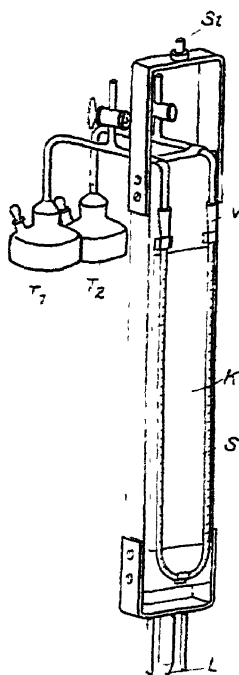



Abb 3

K=Manometerkapillare von 0,2qmm Querschnitt V=Verbindungsschliff. T_1=Trog mit Zellsuspension und kohlensäurehaltiger Luft gefullt T_2=Trog mit Salzlösung und kohlensäurehaltiger Luft gefüllt St=Stift, der in das Loch der Exzenterscheibe paßt L=Spitzenlager S=Spiegel

VI.

Zur Messung der chemischen Arbeit, der Große U unseres Quotienten, wurde der Assimilationstrog, nach Füllung mit kohlensaurehaltiger Luft, mit dem einen Schenkel eines BARCROFTschen Differentialmanometers[1] verbunden (Abb 3) An dem anderen Manometerschenkel befand sich ein ahnlicher Trog, der an Stelle der Zellsuspension zellfreie Salzlosung enthielt Bei dieser Anordnung zeigte das Manometer nur solche Druckanderungen an, die von der Tatigkeit der Zellen herruhrten, wahrend Schwankungen der Temperatur und des Atmospharendruckes ohne Einfluß auf den Stand des Manometers waren

Die mit dem Manometer verbundenen Troge wurden mittels einer Exzenterscheibe — bei kleinen Exkursionen, jedoch hohen Tourenzahlen — schnell geschüttelt, so daß Gas- und Flussigkeitsphase in jedem Augenblick nahezu im Gleichgewicht waren Die Temperatur des Thermostaten war hierbei 10° und wurde auf einige hundertstel Grade konstant gehalten

[1] BARCROFT, J. Journ of Physiology 37, 12. 1908.

Wird in dem Trog Sauerstoff in Kohlensäure verwandelt, so nimmt der Druck ab, weil Kohlensäure in Wasser leichter löslich ist, als Sauerstoff. Wird Kohlensäure in Sauerstoff verwandelt, so nimmt aus dem gleichen Grund der Druck zu. Kennt man die Volumina der gasförmigen und flüssigen Phase, so ergibt die Anwendung der Gasgesetze und des HENRIschen Absorptionsgesetzes einen einfachen Ausdruck für die umgesetzte Sauerstoffmenge, die einer Druckänderung von einem Millimeter entspricht.

Da die Entwicklung eines Mols Sauerstoff einer Zunahme der Gesamtenergie von 112300 cal entspricht, so war, wenn v ccm Sauerstoff entwickelt waren

$$U = v \frac{112300}{22400} \text{ cal.}$$

Was die Genauigkeit der Messungen anbetrifft, so hing alles davon ab, ob es gelang, die Atmung hinreichend stationär zu halten. War das der Fall, so wurde die Atmung in Perioden von 5 Minuten, die Wirkung der Bestrahlung in Perioden von 10 Minuten bestimmt und v mit einer Genauigkeit von 5% erhalten. Dies also war der Fehler bei der Messung der Größe U, der als solcher in den Quotienten $\frac{U}{E}$ einging. Der Fehler bei der Messung der Größe E — mit 1% — war hiergegen klein.

VII.

Einige Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Wir finden in der ersten Spalte die Intensität J an der Eintrittsstelle in den Trog, in der zweiten Spalte das Produkt JFt, die in der Bestrahlungszeit absorbierte Energie E. Es folgt in der dritten Spalte der beobachtete Manometerausschlag Δh, in der vierten Spalte die Gefäßkonstante K[1], die mit Δh multipliziert den in der fünften Spalte stehenden Wert von v ergibt. In der sechsten Spalte ist der aus v berechnete Wert von U verzeichnet, in der siebenten Spalte der Quotient $\frac{U}{E}$, in der achten Spalte der Grenzwert $\lim \frac{dU}{dE}$ für $E = 0$.

Es ergibt sich aus der Tabelle, daß im Mittel etwa 70% der absorbierten Strahlungsenergie in chemische Energie umgewandelt werden können. Der höchste bisher gemessene Wert liegt nach einer Angabe von

[1] Vgl. die Bemerkungen zu Abschnitt VI, Formel 12.

Brown und Escombe um 6% Indessen sind die Versuche von Brown und Escombe[1], die mit anderen Objekten und mit Strahlung von anderer spektraler Zusammensetzung angestellt wurden, mit den unsrigen kaum vergleichbar.

Erinnern wir uns, daß wir zwei Fehler begehen, die den Wert unserer Quotienten herabdrucken — von denen der eine mit der Atmungsmessung, der andere mit der Absorptionsmessung zusammenhangt — so müssen wir die Werte der Tabelle als Minimalwerte betrachten Die Ausbeuten an chemischer Energie waren möglicherweise großer, als es den Anschein hat

Tabelle 1. *Spektralbezirk* $(\lambda) = 570 - 645\ \mu\mu$. *Bestrahlte Fläche* $(F) = 14$ *qcm*
Bestrahlungszeit $(t) = 600$ *Sek*

Nr.	J auffallende Intensität (cal/qcm/Sek.)	$E = J \cdot F \cdot t$ = in t Sek. absorbierte Energie (cal)	Δh = beobachteter Manometerausschlag (mm)	K (Gefäßkonstante)	v = in t Sek. entwickelter Sauerstoff (cmm)	U (cal.)	$\frac{U}{E} \cdot 100$	$\lim_{E=0} \frac{dU}{dE} \cdot 100$
1	$0{,}162 \cdot 10^{-4}$	0,136	6,9	2,23	15,4	0,078	57	72
	$0{,}327 \cdot 10^{-4}$	0,275	10,3		23,0	0,116	42	72
2	$0{,}203 \cdot 10^{-4}$	0,171	8,5	2,23	19,0	0,096	56	67
	$0{,}406 \cdot 10^{-4}$	0,341	3,8		30,8	0,155	45	
3	$0{,}212 \cdot 10^{-4}$	0,178	9,4	2,23	21,0	0,106	60	73
	$0{,}424 \cdot 10^{-4}$	0,356	14,5		32,4	0,163	46	
4	$0{,}215 \cdot 10^{-4}$	0,181	8,8	2,23	19,7	0,099	55	69
	$0{,}430 \cdot 10^{-4}$	0,362	13,1		29,2	0,147	41	
5	$0{,}215 \cdot 10^{-4}$	0,181	9,1	2,23	20,3	0,102	56	66
	$0{,}430 \cdot 10^{-4}$	0,362	15,3		34,1	0,172	48	
6	$0{,}197 \cdot 10^{-4}$	0,166	8,4	2,33	19,6	0,099	60	64
	$0{,}389 \cdot 10^{-4}$	0,327	15,5		36,2	0,183	56	
7	$0{,}202 \cdot 10^{-4}$	0,169	10,3	2,33	24,0	0,121	72	92
	$0{,}397 \cdot 10^{-4}$	0,334	14,7		34,0	0,173	52	
8	$0{,}182 \cdot 10^{-4}$	0,153	7,8	2,33	18,2	0,092	60	72
	$0{,}358 \cdot 10^{-4}$	0,301	12,2		28,5	0,144	48	
9	$0{,}178 \cdot 10^{-4}$	0,149	7,3	2,33	17,0	0,086	58	60
	$0{,}350 \cdot 10^{-4}$	0,295	13,8		32,2	0,162	55	
10	$0{,}178 \cdot 10^{-4}$	0,149	8,3	2,33	19,4	0,098	66	68
	$0{,}350 \cdot 10^{-4}$	0,295	15,8		36,9	0,186	63	
11	$0{,}173 \cdot 10^{-4}$	0,145	8,8	2,33	20,5	0,103	71	83
	$0{,}343 \cdot 10^{-4}$	0,288	14,7		34,3	0,173	60	
12	$0{,}175 \cdot 10^{-4}$	0,147	7,2	2,33	16,8	0,085	58	65
	$0{,}347 \cdot 10^{-4}$	0,291	12,5		29,2	0,147	51	
							Mittel:	71

[1] Brown u. Escombe Proc. of the roy. soc of London, B. 76, 24 1905

Es ist nicht ohne Interesse, den Energieumsatz bei der Kohlensaureassimilation mit dem Energieumsatz bei einfachen chemischen Reaktionen zu vergleichen. Bestrahlt man mit der Wellenlange 209 $\mu\mu$, so ist nach E. WARBURG[1]

bei der Reaktion	$\frac{U}{E} \cdot 100$
$3\,O_2 = 2\,O_3$	50
$2\,HBr = H_2 + Br_2$ (gasformig)	18
$2\,HJ = H_2 + J_2$ (gasformig)	2,1

Eine hohere Ausbeute als 50% — im Fall der Ozonisierung des Sauerstoffs durch die Wellenlange 209 $\mu\mu$ — ist unseres Wissens bisher nie gemessen worden.

VIII.

Die nachste Aufgabe ist es nunmehr, das Verhältnis $\frac{U}{E}$ in verschiedenen Spektralbezirken zu messen. Versuche in dieser Richtung sind begonnen, jedoch noch nicht abgeschlossen. Die Schwierigkeit liegt in der Beschaffung einer Lichtquelle von hoher Flachenhelligkeit, die bei spektraler Zerlegung schmale Bezirke hinreichender Intensitat liefert und die lange Zeit konstant brennt.

Immerhin lassen die bisher vorliegenden Versuche erkennen, daß in den Spektralbezirken, in denen die Chromatophorenfarbstoffe am starksten absorbieren, im Blau und im oben erwahnten Bezirk des Rot $\frac{U}{E}$ nicht großer, wahrscheinlich aber etwas kleiner ist als im Gelb und Gelbrot. $\frac{U}{E}$ wurde dann in der Nahe des Gelb ein flaches Maximum zeigen, ahnlich wie die Intensitat der Sonnenstrahlung auf der Erdoberflache[2].

IX.

Bei der Betrachtung der Tabelle fallt auf, daß der Quotient $\frac{U}{E}$ Schwankungen unterworfen ist, die außerhalb der Fehlergrenzen liegen. Viel großer waren die Schwankungen im Gesamtverlauf der etwa 2000 Versuche, indem wir anfangs wenig mehr als 20% fanden. Der Energieumsatz ist also in hohem Maße veranderlich mit dem Zustand der Zelle und es erhebt sich die Frage, ob wir die Bedingungen angeben konnen, unter denen der eine oder andere dieser verschiedenartigen Zustande entsteht.

[1] WARBURG, E.: Quantentheoretische Grundlagen der Photochemie. Zeitschr. f. Elektrochemie 26, 54. 1920.

[2] *Zusatz beim Neudruck:* Dieser Absatz ist unrichtig. Vergleiche die folgende Arbeit.

Die Bedingung, auf die es hier in erster Linie ankommt, ist eine einfache. Züchten wir bei hohen Lichtstarken — etwa in 7 cm Entfernung von einer 75 Wattlampe — so entstehen Zellen, die nur einen geringen Bruchteil der absorbierten Strahlungsenergie in chemische Energie verwandeln können. Züchten wir bei niedriger Lichtstarke — etwa in 30 cm Entfernung von einer 75 Wattlampe — so entstehen Zellen, die einen großen Bruchteil der absorbierten Strahlungsenergie in chemische Energie verwandeln konnen. Man wird in diesem Verhalten eine zweckmaßige Anpassung an außere Verhaltnisse sehen, da offenbar das Interesse der Zelle an der Ausnutzung der eingestrahlten Energie um so großer ist, je weniger Energie ihr in der Zeiteinheit zugeführt wird.

Laßt man hellgezuchtete Zellen bei niedriger Lichtstarke weiterwachsen, so andert sich ihre chemische Zusammensetzung im Lauf weniger Tage, ihre Substanz wird prozentisch reicher an Chlorophyll. Aus „Lichtpflanzen" sind „Schattenpflanzen" geworden, die als feiner schwarzer Sand den Boden der Kulturgefaße bedecken. Dies ist der Zustand, in dem die absorbierte Strahlung am besten ausgenutzt werden kann. Dauernd bei niedriger Lichtstarke gezüchtet, degenerieren die Zellen, sie verkleben und wachsen merklich langsamer. Man darf deshalb die bei niedriger Lichtstarke gewachsenen Zellen nicht zur Nachzucht benutzen, sondern man halt am besten eine Stammkultur bei hellem Tageslicht, laßt von hier aus abgezweigte Kulturen etwa acht Tage bei schwacher Beleuchtung wachsen und mißt dann den Energieumsatz. Tut man das, so wird man immer Material haben, das den großeren Teil der absorbierten Strahlungsenergie in chemische Energie verwandeln kann.

X.

Konnen wir uns durch Variation der Kulturbedingungen Organismen verschaffen, die absorbierte Energie in verschiedenem Maße ausnutzen, so ist es andererseits auch moglich, den Energieumsatz eines gegebenen Organismus direkt zu beeinflussen. Wie bisher, so haben wir im folgenden nur den Energieumsatz bei niedrigen Bestrahlungsintensitaten im Auge, sehen also von den besonderen Faktoren, die den Energieumsatz bei hohen Intensitaten bestimmen, vollig ab.

Bringen wir gewisse chemisch indifferente Stoffe in das Chromatophor hinein, so sinkt die Ausbeute an chemischer Energie, um so mehr, je ausgesprochener diese Stoffe die Eigenschaft haben, an Grenzflachen adsorbiert zu werden[1]. Entfernen wir sie wieder aus dem Chromatophor, so wird der Energieumsatz alsbald wieder normal.

[1] WARBURG, O.: Biochem. Zeitschr. **103**, 188. 1920; Zeitschr. f. Elektrochemie **28**, 70. 1922.

Derartige und andere Versuche, auf die wir hier nicht eingehen, führen zu der Auffassung, daß wir es mit einem Vorgang an Grenzflächen zu tun haben. Wir wollen diese Auffassung folgendermaßen präzisieren. Die in Wasser unlöslichen Chromatophorenfarbstoffe sind mit dem farblosen Gerüst des Chromatophors zu einem festen Adsorbens verbunden. An der Grenze dieses gefärbten Adsorbens gegen den farblosen wässrigen Inhalt des Chromatophors ist die Kohlensäure — in einer noch nicht näher bekannten Form[1] — adsorbiert. Hier in der Grenzschicht, wird die von den Farbstoffen aufgenommene Energie auf das Kohlensäuremolekül übertragen. Es ist damit zunächst die Tatsache erklärt, daß gelöste oder kolloidal verteilte Chromatophorenfarbstoffe nicht imstande sind, bei Bestrahlung Kohlensäure zu spalten. Der Versuch, mit Hilfe vom Chromatophor abgelöster Farbstoffe Kohlensäure zu reduzieren, verlief, so oft er unternommen wurde, negativ.

Betrachten wir die Vorgänge, die sich in der genannten Grenzschicht abspielen, etwas näher, so ergibt zunächst die Anwendung der Quantentheorie, wieviel Energie von einem Farbstoffmolekül bei der Absorption aufgenommen wird. Bei Bestrahlung mit Natriumlicht, dessen Wellenlänge etwa dem Schwerpunkt der von uns angewandten Strahlung entsprechen dürfte, ist der fragliche Energiebetrag etwa 49000 cal (wobei wir der Übersichtlichkeit wegen $h\nu$ mit der Avogadroschen Zahl multiplizieren). Dies also ist die Energie, die ein Mol Chlorophyll bei der Absorption von Natriumlicht aufnimmt.

Um ein Mol Kohlensäure nach der Assimilationsgleichung zu reduzieren, ist eine Energiezufuhr von 112300 cal erforderlich, woraus folgt, daß ein Kohlensäuremolekül mit mindestens 3 Farbstoffmolekülen in Wechselwirkung treten muß. Wie man sich den Vorgang der Energieübertragung im einzelnen auch denken mag, jedenfalls verläuft er unter geeigneten Bedingungen so, daß der größere Teil der absorbierten Strahlungsenergie von dem Kohlensäuremolekül aufgenommen und in ihm zur Leistung chemischer Arbeit benutzt wird. Insbesondere ist hier für Zwischenreaktionen von erheblicher Wärmetönung kein Raum.

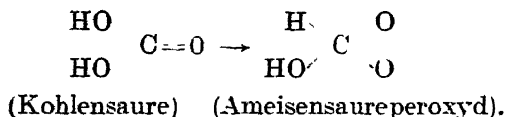
Willstaetter[2] hat die Vermutung ausgesprochen, daß bei der Kohlensäureassimilation aus Kohlensäure oder einem Kohlensäurederivat zunächst Ameisensäureperoxyd entstehe.

---

[1] In einem langsam verlaufenden chemischen Dunkelvorgang, der sogenannten Blackmanschen Reaktion, wird die Kohlensäure, nachdem sie in die Zelle hineindiffundiert ist, zunächst verändert, und zwar offenbar so, daß aus CO_2 oder H_2CO_3 ein stärker adsorbierbarer Stoff entsteht. Die Blackmansche Reaktion bestimmt den Umsatz in chemische Energie bei hohen Bestrahlungsintensitäten, d. h. unter Bedingungen, von denen in dieser Untersuchung nicht die Rede ist.

[2] Willstaetter u. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, S. 416.

$$\begin{matrix} HO \\ HO \end{matrix} \!> C{=}O \rightarrow \begin{matrix} H \\ HO \end{matrix} \!> C < \!\begin{matrix} O \\ O \end{matrix}$$

(Kohlensäure) (Ameisensäureperoxyd).

Die Abspaltung des Peroxydsauerstoffs würde Formaldehyd, die Kondensation des Formaldehyds würde Traubenzucker liefern, beides freiwillig verlaufende mit geringer Wärmetönung verbundene Reaktionen. Die chemische Arbeit wird bei dem ersten Vorgang geleistet, bei dem innerhalb des Kohlensäuremoleküls eine Umlagerung von Atombindungen erfolgt. Dies ist ein von Kohlensäure zum Traubenzucker führender Weg, auf dem — so wie wir es verlangen — Zwischenreaktionen von erheblicher Wärmetönung nicht vorkommen.

XI.

Die bei der Absorption aufgenommene Energie steht einem Molekül nur für kurze Zeit in freiverwandelbarer Form zur Verfügung. Diese Zeit, die sogenannte „Lebensdauer“ des energiereichen Moleküls, schätzt man im allgemeinen auf 10^{-8} Sekunden. Trifft ein Chlorophyllmolekül innerhalb dieser kurzen Zeit nicht auf ein Kohlensäuremolekül, so ist die absorbierte Strahlungsenergie für die chemische Arbeitsleistung verloren[1].

Soll also die absorbierte Energie möglichst vollständig ausgenutzt werden, so darf kein Teil der Oberfläche länger als 10^{-8} Sekunden mit einem anderen Stoff, als mit Kohlensäure bedeckt sein, eine Bedingung, die niemals erfüllt sein kann, weil die Zelle neben Kohlensäure andere adsorbierbare Stoffe, zum mindesten Traubenzucker, in gelöster Form enthält. Diese Stoffe werden Kohlensäure von der Oberfläche verdrängen. Sie werden zwar in kinetischem Austausch mit der Kohlensäure ihre Plätze an der Oberfläche wechseln, jedoch zeitweise bestimmte Oberflächenbezirke blockieren und hier den Umsatz in chemische Energie verhindern.

Die Theorie erklärt in einfacher Weise eine Reihe von Tatsachen: daß eine Zelle, die schwach belichtet wurde — also wenig Zucker enthält — die Energie vollständiger ausnutzt, als eine stark vorbelichtete Zelle, daß chemisch indifferente Stoffe, die an Grenzflächen gehen, den Umsatz in chemische Energie verhindern, daß die schwach adsorbierbare Blausäure, die andere Vorgänge in dem Chromatophor hemmt, ohne Einfluß auf den Energieumsatz ist. Die Theorie erklärt allgemein,

[1] *Zusatz beim Neudruck*: Das Hineinbringen der Lebensdauer der aktivierten Moleküle ist hier überflüssig. Es genügt zu wissen, daß die Energieübertragung ein Vorgang an Oberflächen ist.

warum der Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation keine konstante Größe ist, sondern veränderlich mit dem Zustand der Zelle.

Spezieller Teil.

Zu den Abschnitten II und IX.

Züchtung der Chlorella Stammlösungen zur Herstellung der Kulturflüssigkeit.

I	$MgSO_4\,7\,H_2O$	50 g:	1000 ccm aus Glas destill Wassers	(0,2 molar)
II	KNO_3	25 g:	1000 „ „ „ „	(0,25 „)
III	KH_2PO_4	25 g:	1000 „ „ „ „	(0,18 „)
IV.	$FeSO_4\,7\,H_2O$	2,8 g:	1000 „ „ „ „	(0,01 „)

100 ccm I. 100 ccm II. 100 ccm III und 1 ccm IV wurden mit Leitungswasser auf 1000 ccm aufgefüllt Das Leitungswasser war in bezug auf Ca 2,4 10^{-3} molar, in bezug auf Fe 1 10^{-6} molar Die Kulturflüssigkeit war somit in bezug auf

$MgSO_4$	0,02 molar
KNO_3	0,025 molar
KH_2PO_4	0,018 molar
Ca	0,0024 molar
$FeSO_4$	0,00001 molar

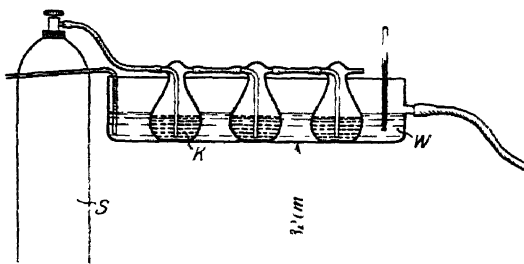



Abb. 4

S = Stahlflasche mit 4% Kohlensäure in Luft W = Wasser von 20° K = Kulturkolben (300 ccm Rauminhalt L = ½ Watt Metallfadenlampe von 75 Watt Stromverbrauch.

Die Anordnung der Kultur ist aus Abb 4 ersichtlich Gaszuleitungs- und Ableitungsrohre sind in die Kolben eingeschmolzen. Schliffe sind vermieden um die Nährlösung vor Verunreinigung mit Dichtungsfett zu schützen

Die Einsaat pro Kolben beträgt 0,05 ccm Zellen (= 10 mg Trockensubstanz) in 250 ccm Kulturflüssigkeit Nach Vermehrung auf das vier- bis fünffache werden die Algen auf der Zentrifuge mehrfach mit frischer Nährlösung gewaschen, in einem graduierten Zentrifugierröhrchen gemessen und dann in die Kolben eingesät Die zur Nachzucht bestimmten Zellen hält man bei natürlichem Licht an einem Nordfenster Die zum Versuch bestimmten Zellen werden im Dunkelzimmer wie in Abb 4 veranschaulicht, eine Woche lang bestrahlt und vermehren sich dabei auf etwa das Vierfache

Trotz der Rührung durch die Gasdurchleitung setzen sich die Algen am Boden der Kolben langsam ab Es genügt, sie im Lauf von 24 Stunden einmal aufzuwirbeln. Fortgesetzte mechanische Schüttelung der Kol-

ben hat nach unsern Erfahrungen keine Vorteile. Die Zellen sollen sich bei leichtem Schutteln der Kolben sofort wieder fein verteilen. Kleben sie am Boden der Kolben oder aneinander, so ist die Kultur auszuscheiden.

Absorptionsspektrum der Chlorella. Bekanntlich zeigt in der Zelle gebundenes Chlorophyll ein etwas anderes Absorptionsspektrum als gelostes Chlorophyll. Betrachtet man das Absorptionsspektrum einer Algensuspension, so erscheint die rote Chlorophyllbande weniger scharf und um etwa 30 $\mu\mu$ nach dem langwelligen Ende des Spektrums verschoben.

Zu den Abschnitten III und IV.

Die Menge des von der Alge in einer bestimmten Zeit aufgenommenen oder abgegebenen Sauerstoffs (in ccm von 0°, 760 mm Hg) sei x_{O_2}, die Menge der von der Alge gleichzeitig aufgenommenen oder abgegebenen Kohlensaure sei x_{CO_2}. Gasaufnahme werde negativ, Gasabgabe werde positiv gerechnet. Wir bilden die Quotienten

$$\frac{-x_{O_2}}{+x_{CO_2}} \text{ (respiratorischer Quotient) und}$$

$$\frac{+x_{O_2}}{-x_{CO_2}} \text{ (assimilatorischer Quotient).}$$

Zur Bestimmung der Quotienten diente ein beiderseitig mit Schwanzhahnen versehener flacher Rezipient (*R* in Abb. 6), dessen etwa 12 ccm fassender Rauminhalt mit 5 ccm Zellsuspension gefullt wurde. Bei geoffneten Hahnen in einen Wasserthermostaten von 10° versenkt, wurde eine Gasmischung bekannter Zusammensetzung durchgeleitet, bis sich die Flussigkeit mit dieser ins Gleichgewicht gesetzt hatte; dann wurden die Hahne geschlossen und der bei Schluß der Hahne herrschende Atmospharendruck notiert. Der Rezipient wurde im Thermostaten bei 10° eine passende Zeit — verdunkelt oder bestrahlt — geschuttelt (Abb. 5) und dann durch Schliff mit dem Meßrohr eines HALDANEschen Analysenapparates verbunden. In dieses wurde der großte Teil der im Gasraum enthaltenen Gase so übergefuhrt, daß eine Entgasung der Zellsuspension vermieden wurde. Dies geschah nach Abb. 6, indem in den vertikal gestellten Rezipienten von unten her 10proz. Kochsalzlosung langsam einfloß. Der Prozentgehalt an Sauerstoff und Kohlensaure wurde dann in bekannter Weise ermittelt.

Zur Berechnung von x_{O_2} und x_{CO_2} bezeichnen wir mit:

- *P* den Gesamtdruck im Rezipienten bei Beginn des Versuchs in mm Hg,
- *P′* den Gesamtdruck im Rezipienten bei Beendigung des Versuchs im mm Hg,

T die Thermostatentemperatur in absoluter Zählung.
p den Sättigungsdruck des Wasserdampfes bei T Grad in mm Hg,
α_{O_2} den Absorptionskoeffizienten des Sauerstoffs in der Suspensionsflüssigkeit bei T Grad.
α_{CO_2} den Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure in der Suspensionsflüssigkeit bei T Grad.
v_F das Volumen der eingefüllten Zellsuspension in ccm.
v_G das Volumen des Gasraumes in ccm.
$b_{O_2} b_{CO_2} b_{N_2}$ den Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 vor dem Versuch.
$b_{O_2}' b_{CO_2}' b_{N_2}'$ den Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 nach dem Versuch.

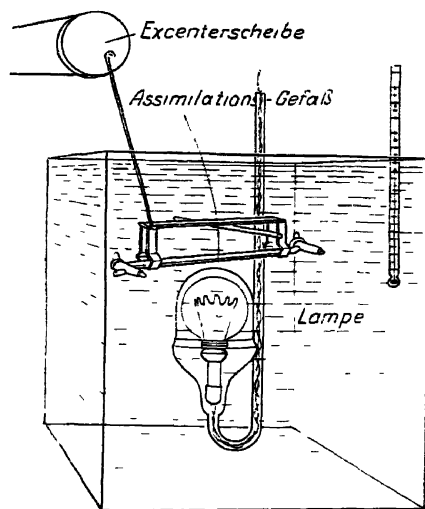



Abb. 5.

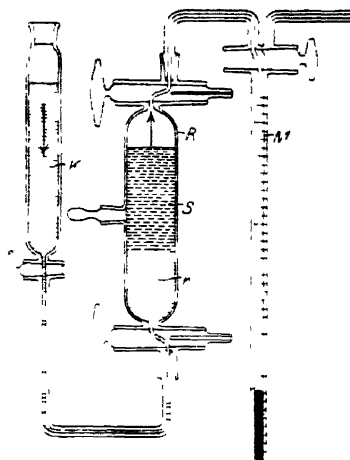



Abb. 6. R Rezipient. S = Zellsuspension. K = 10%ige Kochsalzlösung. M = Meßrohr des HALDANEschen Analysenapparates.

Dann ist

$$x_{O_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}\right)\left(\frac{P' - p}{760}\frac{b'_{O_2}}{100} - \frac{P - p}{760}\frac{b_{O_2}}{100}\right), \quad (1)$$

$$x_{CO_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}\right)\left(\frac{P' - p}{760}\frac{b'_{CO_2}}{100} - \frac{P - p}{760}\frac{b_{CO_2}}{100}\right) \quad (2)$$

Der Gesamtdruck P' nach dem Versuch läßt sich aus dem Resultat der Gasanalyse in einfacher Weise berechnen. Da Stickstoff von der Alge weder gebunden noch entwickelt wird, bleibt der Partialdruck des Stickstoffs während des Versuchs konstant. Ergibt die Analyse

gleichwohl eine Änderung des Prozentgehalts an Stickstoff, so muß sich der Gesamtdruck geändert haben und es gilt

$$(P-p)\frac{b_{N_2}}{100} = (P'-p)\frac{b'_{N_2}}{100},$$

$$P'-p = (P-p)\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} \tag{3}$$

Aus (3), (2) und (1)

$$x_{O_2} = \left[v_G\frac{273}{T} - v_F\,\alpha_{O_2}\right]\frac{P-p}{760\quad 100}\left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}}\,b'_{O_2} - b_{O_2}\right) \tag{4}$$

$$x_{CO_2} = \left[v_G\frac{273}{T} - v_F\,\alpha_{CO_2}\right]\frac{P-p}{760\cdot 100}\left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}}\,b'_{CO_2} - b_{CO_2}\right) \tag{5}$$

Die eckig eingeklammerten Ausdrucke sind fur verschiedene Versuche konstant, wenn man mit denselben Gas- und Flussigkeitsraumen und bei derselben Temperatur arbeitet (in den Protokollen als „Gefaßkonstanten" mit Ko_2 und Kco_2 bezeichnet).

Das Meßrohr des Analysenapparates war in $^1/_{50}$ ccm geteilt, der Ablesungsfehler war etwa $^1/_{100}$ ccm Die Änderungen im Sauerstoff- oder Kohlensauregehalt der eingefuhrten Gasproben betrugen einige $^1/_{10}$ ccm, so daß die Quotienten auf etwa 5% genau bestimmt werden konnten

Beispiele.

Respiratorischer Quotient. Dichte der Zellsuspension 0,2 ccm (= 40 mg) Zellen auf 5 ccm

$$v_F = 5; \quad v_G = 6{,}1; \quad K_{O_2} = 6{,}09; \quad K_{CO_2} = 11\ 9$$

Barometerstand bei Schluß der Hahne 758 mm *Hg* Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 3,72% CO_2, 20,36% O_2, 75,92% N_2 Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 5stundigem Schutteln bei 10° dunkel 8,60% CO_2, 12,28% O_2, 79,12% N_2

$$x_{O_2} = -0{,}515 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = -0{,}532 \text{ ccm}; \quad \frac{-x_{O_2}}{-x_{CO_2}} = 0{,}97$$

Assimilatorischer Quotient Dichte der Zellsuspension 0,1 ccm (= 20 mg) Zellen auf 5 ccm

$$v_F = 5; \quad v_G = 6{,}1; \quad K_{O_2} = 6{,}09; \quad K_{CO_2} = 11{,}9$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch 6,86% CO_2, 19,6% O_2, 73,54% N_2. Barometerstand bei Schluß der Hähne 763 mm *Hg* Pro-

zentische Zusammensetzung der Gasmischung nach $1^1/_2$-stündigem Schütteln bei 10° und Belichtung durch eine 25 Watt Metallfadenlampe in 8 cm Entfernung: 3,125% CO_2, 26,37% O_2, 70,5% N_2.

$$x_{O_2} = +0,475 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0,425 \text{ ccm}; \quad \frac{+x_{O_2}}{-x_{CO_2}} = 1,12$$

Assimilatorischer Quotient. Dichte der Zellsuspension: 0,1 ccm (= 20 mg) Zellen auf 5 ccm

$$v_F = 5; \quad v_G = 6,1; \quad K_{O_2} = 6,09; \quad K_{CO_2} = 11,9$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 6,86% CO_2, 19,6% O_2, 73,54% N_2. Barometerstand bei Schluß der Hähne: 758 mm *Hg*. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 2stündigem Schütteln bei 10° und Belichtung wie im vorhergehenden Versuch: 0,32% CO_2, 31,19% O_2, 68,49% N_2.

$$x_{O_2} = -0,847 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = -0,778 \text{ ccm}; \quad \frac{-x_{O_2}}{-x_{CO_2}} = 1,09$$

Assimilatorischer Quotient. Dichte der Zellsuspension: 0,1 ccm (= 20 mg) Zellen auf 5 ccm.

$$v_F = 5; \quad v_G = 6,1; \quad K_{O_2} = 6,09; \quad K_{CO_2} = 11,9.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 6,86% CO_2, 19,6% O_2, 73,54% N_2. Barometerstand bei Schluß der Hähne: 755 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach $1^1/_2$-stündigem Schütteln bei 10° und Belichtung wie im vorhergehenden Versuch: 3,20% CO_2, 26,11% O_2, 70,69% N_2.

$$x_{O_2} = -0,452 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = -0,412 \text{ ccm}; \quad \frac{-x_{O_2}}{-x_{CO_2}} = 1,1$$

Zu Abschnitt V

Das zur Strahlungsmessung benutzte Bolometer bestand aus zwei Rahmenpaaren. Jeder Rahmen enthielt zehn mit Platinschwarz bedeckte Platinstreifen von 34 mm Länge und etwa 1,8 mm Breite und besaß einen Widerstand von etwa 20 Ohm. Je zwei hintereinander geschaltete Rahmen bildeten einen Zweig der WHEATSTONEschen Brücke. Die Schaltung der Brücke, des Galvanometers und des Kompensationskreises ergibt sich aus Abb. 7.

Abb. 7.

R = Widerstand, durch den die Empfindlichkeit des Galvanometers variiert werden kann. *G* = Galvanometer. *K* = Kompensationswiderstand.

Jedes Rahmenpaar war so montiert, daß die Zwischenräume des einen Gitters durch die Streifen des andern Gitters überdeckt wurden, wodurch

eine Fläche von etwa 1000 qmm entstand. Mit Hilfe einer Reihe verschieden großer Blenden wurde die „nutzbare" Bolometerfläche nach E. WARBURG[1] ermittelt, ein in der Mitte der Fläche liegender Bezirk von etwa 300 qmm.

Die Rahmenpaare befanden sich in einem mit Fenster versehenen Kasten, dessen Wände — von innen nach außen — aus starkwandigem Kupfer, mehrfachen Lagen Asbestpappe und aus Holz bestanden. Das Fenster war verschließbar durch eine Quarzscheibe, die nur zur Eichung herausgenommen wurde.

Eichung des Bolometers. Die nach GERLACH[2] aufgestellte Hefnerlampe war 1 m von der Bolometerblende (275 qmm) entfernt. Temperatur des Raumes 15°. Spannung des Brückenakkumulators 2,00 Volt. Spannung des Kompensationsakkumulators 2,01 Volt. Galvanometerausschlag etwa 33 Skalenteile. Um das Galvanometer auf die Nullstellung zurückzubringen, mußten in den Kompensationskreis 11400 Ohm gelegt werden.

Setzt man nach GERLACH[3] die Energie, die pro Sekunde durch 1 qcm der Blendenöffnung geht, gleich $22{,}6 \cdot 10^{-6}$ cal, so ist die Intensität J, bei der ω Ohm zur Kompensation des Galvanometerausschlags erforderlich sind,

$$J = \frac{11400}{\omega} \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6} \text{ cal/sek/qcm}, \tag{1}$$

falls Blendenöffnung, Zimmertemperatur und Spannung der Akkumulatoren dieselben sind wie bei der Eichung.

Für die Zimmertemperatur[4] t, die Spannung des Brückenakkumulators V_B und die Spannung des Kompensationsakkumulators V_K ist

$$J = \frac{11400}{\omega\left(1 + 0{,}01 \cdot \frac{15 - t}{3}\right)} \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{V_K}{2{,}01} \cdot \frac{2{,}00}{V_B} \tag{2}$$

Korrektion. War das Bolometer geeicht, so wurde das Fenster mit der Quarzplatte verschlossen und der Kasten, wie in Abschnitt III beschrieben, in den Thermostaten eingesetzt. Das Wasser des Thermostaten reichte bis nahe an die Bolometerblende, ohne sie jedoch

[1] WARBURG, E.: Zeitschr. f. Elektrochemie 1921, S. 135.

[2] GERLACH, W.: Physik. Zeitschr. 14, 577. 1903.

[3] GERLACH, W.: Physik. Zeitschr. 14, 577. 1903.

[4] Vgl. E. WARBURG u. C. MÜLLER: Über einige Eigenschaften des Bolometers. Verh. d. D. Physik. Ges. 18, 245. 1916.

zu berühren Wir hatten so dreimal einen Strahlungsverlust durch Reflexion, nämlich an der Grenze Wasser-Luft, Luft-Quarz und Quarz-Luft Andererseits tauchte der Assimilationstrog in das Wasser ein und wir hatten zweimal einen Strahlungsverlust durch Reflexion nämlich an der Grenze Wasser-Glas und Glas-Wasser

Den reflektierten Bruchteil a der Strahlung setzen wir nach FRESNELs Formel für senkrechte Incidenz

$$= \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^2 \quad (n \text{ das Brechungsverhältnis}).$$

Wir finden so

für den Übergang	a
Wasser-Luft .	0,02
Luft-Quarz . . .	0,047
Quarz-Luft . .	0,044
Wasser-Glas . .	0,0055
Glas-Wasser . .	0,005

Mit Hilfe dieser Zahlen war die nach Formel (2) berechnete Intensität J zu korrigieren und es ergab sich die gesuchte Intensität, die pro Sekunde und qcm in die Zellsuspension eintretende Energie

$$J_{\text{korr}} = 1,1 \ J$$

Die Strahlungsquelle war auf einer eisernen Schiene verschiebbar wie auf einer Photometerbank Durch Verschieben der Lampe auf der Schiene wurden die Intensitäten der Bestrahlung variiert

Die Schiene und die Stellung der Lampe zur Schiene wurden so fixiert, daß die Intensität der Strahlung in der ganzen Fläche des Assimilationstroges gleich war Die bestrahlte Fläche des Assimilationstroges war 1400 qmm die Bolometerblende 275 qmm Durch Verschieben des Bolometers konnte die Intensität an verschiedenen Stellen der 1400 qmm gemessen werden Unter Kontrolle mittels des Bolometers ließ sich die Lampe leicht so einstellen daß die Intensität der Strahlung an verschiedenen Stellen der 1400 qmm um weniger als 1% differierte

Blende des Assimilationstroges Um Strahlungsverluste durch Zerstreuung nach den Seiten zu vermeiden war am Boden des Assimilationstroges eine ringförmige Blende befestigt die einen 0,5 mm breiten Ring vom Rande her abblendete Die bestrahlte Fläche war also kleiner als der Boden des Assimilationstroges

Die Absorptionströge befanden sich in einem großen mit Wasser gefüllten Trog, dessen Temperatur innerhalb eines Grades konstant

gehalten wurde. Dies war notwendig, weil sich die Absorptionskoeffizienten unserer Flüssigkeiten mit der Temperatur erheblich änderten.

Interpolation für die Intensität Null. Wir bezeichnen mit

I die Intensität der Strahlung an der Eintrittsstelle in den Assimilationstrog,

d die Höhe der Zellsuspension in dem Assimilationstrog,

F die bestrahlte Fläche des Assimilationstroges,

E die pro Sekunde in dem ganzen Trog absorbierte Strahlungsenergie,

U die pro Sekunde in dem ganzen Trog geleistete chemische Arbeit.

Dann ist in der Entfernung x vom Boden des Assimilationstroges die Intensität der Strahlung

$$i = I\varphi(x)$$

und die zwischen x und $x + dx$ pro Sekunde absorbierte Energie

$$dE = FI\varphi'(x)\,dx$$

oder die in dem ganzen Trog pro Sekunde absorbierte Energie

$$E = FI\int_0^d \varphi'(x)\,dx$$

Für große Werte von d, das heißt für vollständige Absorption, wird das bestimmte Integral

$$\int_0^d \varphi'(x)\,dx = 1 \quad \text{und} \quad E = FI$$

Nach Abb. 1 ist U im allgemeinen nicht proportional E, sondern in komplizierterer Weise von E abhängig. Entwickeln wir die unbekannte Funktion $U = \Psi(E)$ in eine Potenzreihe, die wir mit dem quadratischen Glied abbrechen, so können wir schreiben

$$U = a + bE + cE^2, \tag{1}$$

worin a, b und c Konstanten bedeuten. Für $E = 0$ ist $U = 0$, folglich $a = 0$. b und c werden mit Hilfe von zwei Messungen bei zwei verschiedenen Intensitäten ermittelt. Insbesondere findet man die Konstante

$$b = \frac{U_2 E_1^2 - U_1 E_2^2}{E_2 E_1^2 - E_1 E_2^2} \tag{2}$$

Differenzieren wir Gleichung (1) nach E, so erhalten wir

$$\frac{dU}{dE} = b + 2cE$$

und für $E = 0$

$$\lim_{E=0} \frac{dU}{dE} = b$$

Die nach Gleichung (2) berechnete Konstante b ist also der gesuchte Grenzwert, der Energieumsatz unter der Bedingung, daß U proportional E, das heißt, daß in jeder Elementarschicht der Zellsuspension dU proportional dE ist.

In der graphischen Darstellung (Abb. 1) der Funktion $U = \Psi(E)$ bedeutet die Konstante b den Tangens des Winkels, unter dem die Kurve $\Psi(E)$ aus dem Koordinatenanfangspunkt aufsteigt.

Zu Abschnitt VI.

Der Thermostat bestand aus (unbelegten) Spiegelglasscheiben, die wie die Wände einer Absorptionsküvette wasserdicht verbunden waren. Er wurde mit Wasser gefüllt und durch Kühlwasser, das ihn durchfloß, auf 10° gehalten. Das Kühlwasser zweigten wir von einem breiten, schnell durchflossenen Rohr mittels eines Rossignolventils — wie man es zur Regulierung von Gasströmen benutzt — ab und konnten so die Temperatur leicht auf einige 1/100 Grade konstant halten. Zur Rührung diente ein schnellrotierender Glasflügel.

Die Temperatur von 10° wurde gewählt, weil die Atmung bei 10° nur halb so groß war wie bei 20°, der Temperatur, bei der die Zellen gezüchtet waren. Es kam hinzu, daß wir bei 10° die Ausbeute höher fanden als bei 20°. Dies beruhte jedoch nicht — wie wir früher glaubten[1] — auf einer Beeinflussung des Energieumsatzes durch die Temperatur, sondern darauf, daß die Atmung nach der Belichtung bei 20° schneller absank als bei 10° und so der in Abschnitt IV besprochene Fehler bei 20° größer war als bei 10°.

Die Manometerkapillare hatte einen Querschnitt von 0,178 qmm. Jeder Schenkel war etwa 350 mm lang und über eine Strecke von 300 mm in mm geteilt. Hinter der Kapillare befand sich ein Spiegel.

Als Sperrflüssigkeit benutzten wir Isokapronsäure (Isobutylessigsäure). Vor andern Sperrflüssigkeiten hat sie den Vorzug, daß sie — obwohl relativ leicht beweglich — bei Zimmertemperatur einen ver-

[1] WARBURG, O., Theorie der Kohlensäureassimilation. Die Naturwissenschaften, 1921, Heft 18.

schwindend kleinen Dampfdruck besitzt, daß sie ferner Fett löst und so die Wände der Kapillare selbst reinigt. Ihr spezifisches Gewicht fanden wir bei 15° = 0,926, woraus sich der „Normaldruck in Kapronsäure" $= \frac{760 \cdot 13{,}6}{0{,}926} = 11160$ mm berechnet.

Da die Steighöhe der Kapronsäure in einer Kapillare von dem genannten Querschnitt etwa 24 mm beträgt, so durften nur gut kalibrische Kapillaren für das Manometer verwendet werden. Beim Verschieben eines kleinen Quecksilberfadens in unserer Kapillare fanden wir die größte Differenz des Durchmessers gleich 0,5 %, eine Differenz, die auf Steighöhen umgerechnet 0,12 mm Kapronsäure bedeutet.

Die Tröge, die mit dem Manometer verbunden wurden, unterscheiden wir als „Versuchstrog" — in den die Zellsuspension eingefüllt wurde — und als „Kontrolltrog" — in den die Salzlösung eingefüllt wurde (Abb. 3). Die Böden der Tröge hatten einen Durchmesser von etwa 55 mm, der Rauminhalt der Tröge war etwa 56 ccm. Ihre Form ist aus Abb. 3 ersichtlich. Mit Hilfe von Glasperlen wurde der Rauminhalt des Kontrolltroges dem des Versuchstroges bis auf $^1/_{10}$ ccm gleichgemacht.

Die Tröge waren aus einem Stück geblasen, wobei besonders auf fehlerfreie Beschaffenheit der Böden geachtet wurde. Sprengte man die geblasenen Böden ab und ließ an ihre Stelle planparallele Böden aufbrennen, so wurden keine besseren Ausbeuten erhalten. Es ist daraus zu schließen, daß beim Durchgang der Strahlung durch einen gutgeblasenen Boden keine nennenswerte Verluste entstehen.

Die Füllung der Tröge. Die Tröge wurden zu etwa $^2/_3$ mit Flüssigkeit gefüllt und zwar der Kontrolltrog mit einer Salzlösung, die in bezug auf

$MgSO_4$	0,02	molar
KNO_3	0,025	„
KH_2PO_4	0,018	
$FeSO_4$	0,00005	

war, der Versuchstrog mit derselben Salzlösung, in der 0,4 ccm Zellen (= 200 mg Trockensubstanz) suspendiert waren. Diese Zellmenge genügte zur vollständigen Absorption der Strahlung nicht nur bei ruhendem Trog, sondern in jeder durch die Schüttelbewegung hervorgerufenen Lage der Zellsuspension.

Waren die Flüssigkeiten eingefüllt, so wurde zunächst mittels eines kleinen Röhrchens eine Gasmischung von 4 Volumenprozent Kohlensäure in Luft bis zur annähernden Sättigung durchgeleitet. Dann

wurden die Troge mit dem Manometer verbunden und die Gasraume der Troge mit der gleichen Gasmischung gefullt, indem das Gas durch den Hahn der Verbindungskapillare (Abb 3) eintrat, durch den Tubus des Troges austrat. So vorbereitet wurde der Apparat in die Schuttelvorrichtung des Thermostaten eingespannt.

Schüttelvorrichtung Die mit 400 Touren pro Minute rotierende Scheibe E (Abb. 2) war mit einem Loch versehen, in das der Zapfen St (Abb. 3) des Manometerbugels eingesetzt wurde Der Mittelpunkt des Loches war 2 mm von der Scheibenachse entfernt Indem die Troge sich schnell ohne große Exkursionen um ihre Ruhelage bewegten, wurden Flussigkeits- und Gasphase gemischt, ohne daß in der Flüssigkeit „Trichter" — die einen Verlust an Strahlung verursacht hatten — auftraten

Um das Hochkriechen von Flussigkeit aus den Trogen in die Kapillare zu verhindern, waren die Verbindungshelme innen mit (festem) Paraffin ausgegossen Den Flüssigkeiten — sowohl der Salzlosung als auch der Zellsuspension — war eine Spur flüssigen Paraffins zugesetzt Wir erreichten so, daß Blasen, die beim Schutteln an der Phasengrenze auftraten, bei Unterbrechung des Schuttelns sofort platzten, eine Vorbedingung fur genaue Druckmessungen

Durch eine besondere Vorrichtung konnte die Schuttelung schnell unterbrochen und wieder in Gang gesetzt werden Die Ablesung des Druckes geschah bei stillstehendem Apparat und dauerte 10—15 Sekunden, wahrend deren praktisch kein Ausgleich zwischen Flussigkeits- und Gasphase stattfand Wurde der Apparat zu den Zeiten 0 t_1, t_2 angehalten, so ergaben die Ablesungen die Atmung oder Assimilation fur die Zeitintervalle $t_1 - 0$ und $t_2 - t_1$ Die Zeitpunkte des Anhaltens also, nicht etwa die mittleren Zeiten der Ablesung bestimmten die Dauer der Versuchsperioden

Nachwirkung Beim Ubergang von Verdunkelung zu Bestrahlung beobachteten wir „Nachwirkungen d h, die Wirkung der Bestrahlung schien erst einige Zeit nach Beginn der Bestrahlung einzusetzen nach Verdunkelung noch einige Zeit fortzudauern Die Erscheinung hat mit der fruher beschriebenen photochemischen Induktion[1] — die nur bei sehr hohen Bestrahlungsintensitaten auftritt — nichts zu tun sondern war bedingt durch die Zeit, die der Konzentrationsausgleich zwischen Zellinnerem und umgebender Flussigkeit zwischen Flussigkeit und Gasraum, in Anspruch nahm Unter diesen Umstanden durfte die Wirkung der Bestrahlung nicht direkt nach Unterbrechung der Bestrahlung abgelesen werden, sondern erst nach Ablauf einer gewissen Dunkelzeit.

---

[1] WARBURG, O · Biochem Zeitschr. **103**, 188. 1920

Berechnung. Die Aufgabe, aus der am Manometer auftretenden Niveaudifferenz die in dem Versuchstrog entwickelte Sauerstoffmenge zu berechnen, zerlegen wir in zwei Teile.

1. Wir berechnen zunachst die Niveaudifferenz h, die auftritt, wenn in den Gasraum des Versuchstroges v_0 cmm irgendeines Gases entwickelt werden. Es sei

V das Volumen des Gasraumes — sowohl des Kontrolltrogs, als auch des Versuchstrogs — bis zum Meniskus der auf gleichem Niveau stehenden Sperrflussigkeit in cmm,

A der Querschnitt der Manometerkapillare in qmm,

T die (absolute) Versuchstemperatur,

P_0 der Normaldruck in mm Kapronsaure,

P der Gesamtdruck in den Trogen bei Beginn des Versuchs (Atmospharendruck bei Schluß der Hahne) in mm Kapronsaure,

v_0 die in den Gasraum des Versuchstroges entwickelte, auf Normalverhältnisse reduzierte Gasmenge in cmm,

h die der Entwicklung von v_0 cmm Gas entsprechende Niveauanderung in mm Kapronsäure,

P_1 der Druck in dem Versuchstrog, in dessen Gasraum v_0 cmm Gas entwickelt worden sind.

Dann haben wir

$$v_0 = \frac{P_1}{P_0}\frac{273}{T}\left(V - A\frac{h}{2}\right) - \frac{P}{P_0}\frac{273}{T}V \tag{1}$$

$$P_1 = h + P\frac{V}{V - A\frac{h}{2}} \tag{2}$$

Ist das Volumen der Manometerkapillare klein gegen den Gesamtgasraum, so wird nach Elimination von P_1

$$v_0 = h\left[\frac{273}{T}\frac{V + AP}{P_0}\right] \tag{3}$$

Dies ist die von BARCROFT für sein Differentialmanometer gegebene Formel

Schwankungen des Atmospharendrucks P von 750—770 mm Hg andern den in der eckigen Klammer stehenden Ausdruck nicht merklich, wenn A klein ist Fur eine gegebene Temperatur und ein gegebenes Volumen V ist dieser Ausdruck also konstant, er soll mit k bezeichnet werden (3) wird dann

$$v_0 = hk \tag{4}$$

k bedeutet hier die (auf Normalverhaltnisse reduzierten) cmm Gas, die der Niveauanderung von 1 mm Kapronsaure entsprechen.

k wird nach Barcroft, sowie Munzer und Neumann[1] am einfachsten bestimmt, indem man eine bekannte Gasmenge v_0 in den Versuchstrog hineindruckt und h notiert k ist dann gleich $\frac{v_0}{h}$.

2 v_0 ist in dem Assimilationsversuch die Differenz der in dem Gasraum entwickelten Sauerstoffmenge und der aus dem Gasraum verschwundenen Kohlensauremenge. Die weitere Aufgabe besteht nun darin, aus der beobachteten Große h und der nach (4) berechneten Große v_0 die in den ganzen Trog — in den Gasraum und in die Flüssigkeit — entwickelte Sauerstoffmenge zu berechnen

Wir setzen

$$v_0 = \beta v_0 - (\beta - 1)\, v_0, \tag{5}$$

worin βv_0 die in den Gasraum entwickelte Sauerstoffmenge, $(\beta - 1)\, v_0$ die aus dem Gasraum verschwundene Kohlensauremenge bedeutet

Wir setzen ferner

$$h = \beta h - (\beta - 1)\, h, \tag{6}$$

worin wir unter βh die Zunahme des Sauerstoffpartialdrucks, $(\beta - 1)\, h$ die Abnahme des Kohlensaurepartialdrucks verstehen, die einer Entwicklung von v_0 cmm Gas in den Gasraum entsprechen

Sei weiterhin

x_{O_2} die in den ganzen Trog entwickelte Sauerstoffmenge in cmm (auf Normalverhaltnisse reduziert),

x_{CO_2} die aus dem ganzen Trog verschwundene Kohlensauremenge in cmm (auf Normalverhaltnisse reduziert),

α_1 der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs bei T^0 in der Salzlosung,

α_2 der Absorptionskoeffizient der Kohlensaure bei T^0 in der Salzlosung,

v_F das Volumen der in den Trog eingefullten Flussigkeit in cmm,

so haben wir

$$x_{O_2} = \beta v_0 + \beta \frac{h}{P_0} v_F \alpha_1 \tag{7}$$

$$x_{CO_2} = (\beta - 1)\, v_0 + (\beta - 1) \frac{h}{P_0} v_F \alpha_2 \tag{8}$$

[1] Biochem. Zeitschr. 81, 319. 1917.

und wenn wir den assimilatorischen Quotient = 1 setzen, als dritte Gleichung

$$x_{O_2} = x_{CO_2} \tag{9}$$

Eliminieren wir aus (7), (8) und (9) β und x_{CO_2}, so wird

$$x_{O_2} = \frac{\left(v_0 - \frac{h\,v_F\,\alpha_2}{P_0}\right)\left(v_0 + \frac{h\,v_F\,\alpha_1}{P_0}\right)}{\frac{h\,v_F\,(\alpha_2 - \alpha_1)}{P_0}} \tag{10}$$

Setzen wir nach (4) $v_0 = h\,k$, so wird

$$x_{O_2} = h \left[\frac{\left(k - \frac{v_F\,\alpha_2}{P_0}\right)\left(k + \frac{v_F\,\alpha_1}{P_0}\right)}{\frac{v_F\,(\alpha_2 - \alpha_1)}{P_0}}\right] \tag{11}$$

Der in der eckigen Klammer stehende Ausdruck ist fur gegebene k und v_F konstant Wir bezeichnen ihn mit K K bedeutet die (auf Normalverhältnisse reduzierten) in den ganzen Trog entwickelten cmm Sauerstoff, die der Niveauanderung von 1 mm Kapronsaure entsprechen.

Zahlenbeispiel Wir geben die Abmessungen fur ein oft benutztes Differentialmanometer und die Werte fur T, α_1 und α_2, die unseren Versuchsbedingungen entsprechen.

$V = 16440$, $A = 0{,}178$, $T = 283$, $P_0 = 11160$ — woraus nach (3) und (4) folgt $k = 1{,}59$

Ferner:

$v_F = 38000$, $\alpha_1 = 0{,}038$[1], $\alpha_2 = 1{,}182$[1] — woraus nach (11) folgt $K = 2{,}49$

Korrektionen

1. Nach Gleichung (2) ist die Druckanderung ΔP in dem Versuchstrog, wenn die Niveauanderung der Sperrflussigkeit h mm betragt

$$\Delta P = h + P\left(\frac{V}{V - A\frac{h}{2}} - 1\right).$$

[1] Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs und der Kohlensäure bei 10°, korr. für die Salzlösung nach GEFFKEN, Zeitschr f. physik Chemie 49, 257. 1904.

Beispiel eines Versuchsprotokolls t *(Bestrahlungszeit in Sek)* F *(bestrahlte Fläche)* = *14 qcm.* $K = 2{,}23$.

Zeit	Δh				
600″ hell 300″ dunkel	vorbehandelt				$J = 0{,}424 \cdot 10^{-4}$ cal/Sek./qcm
300″ dunkel	− 6,5	300″ dunkel	− 6,25		$J \cdot F \cdot t = E = 0{,}356$ cal
600″ hell 300″ dunkel	− 4,1	900″ dunkel	− 18,75	Differenz	$\Delta'h$ (Mittel) = 14,45 mm
300″ dunkel	− 6,0	600″ hell 300″ dunkel	− 4,1	$\Delta'h = + 14{,}65$	$\Delta'h \cdot k = v = 32{,}3$ cmm
600″ hell 300″ dunkel	− 3,3	300″ dunkel	− 5,85		$U = 0{,}163$ cal
300″ dunkel	− 5,7	900″ dunkel	− 17,55	Differenz	$\frac{U}{E} \cdot 100 = 45{,}7$
		600″ hell 300″ dunkel	− 3,3	$\Delta'h = + 14{,}25$	
600″ hell 300″ dunkel	vorbehandelt				$J = 0{,}212 \cdot 10^{-4}$ cal/Sek./qcm
300″ dunkel	5,0	300″ dunkel	− 5,05		$J \cdot F \cdot t = E = 0{,}178$ cal
600″ hell 300″ dunkel	6,0	900″ dunkel	− 15,15	Differenz	$\Delta'h$ (Mittel) = 9,37 mm
300″ dunkel	5,1	600″ hell 300″ dunkel	− 6,0	$\Delta'h = + 9{,}15$	$\Delta'h \cdot k = v = 20{,}9$ cmm
600″ hell 300″ dunkel	5,7	300″ dunkel	5,1		$U = 0{,}105$ cal
300″ dunkel	5,1	900″ dunkel	− 15,3	Differenz	$\frac{U}{E} \cdot 100 = 59$
		600″ hell 300″ dunkel	− 5,7	$\Delta'h = + 9{,}6$	
600″ hell 300″ dunkel	vorbehandelt				
300″ dunkel	5,1	300″ dunkel	− 5,1		$J = 0{,}424 \cdot 10^{-4}$ cal/Sek./qcm
600″ hell 300″ dunkel	1,1	900″ dunkel	− 15,3	Differenz	$J \cdot F \cdot t = E = 0{,}356$ cal
300″ dunkel	5,1	600″ hell 300″ dunkel	− 1,1	$\Delta'h = + 14{,}2$	$\Delta'h$ (Mittel) = 14,5 mm
600″ hell 300″ dunkel	0,3	300″ dunkel	5,1		$\Delta'h \cdot k = v = 32{,}4$ cmm
300″ dunkel	5,1	900″ dunkel	− 15,3	Differenz	$U = 0{,}163$ cal
600″ hell 300″ dunkel	0,5	600″ hell 300″ dunkel	− 0,3	$\Delta'h = + 15{,}0$	$\frac{U}{E} \cdot 100 = 45{,}7$
300″ dunkel	1,8	300″ dunkel	4,95		
		900″ dunkel	14,85	Differenz	
		600″ hell 300″ dunkel	− 0,5	$\Delta'h = + 14{,}35$	

$$\lim_{E \to 0} \frac{dU}{dE} \cdot 100 = 72.$$

während wir in Gleichung (6) die beobachtete Niveauänderung h gleich der Änderung des Gesamtdruckes gesetzt haben

Vertauschen wir in Gleichung (10) h durch ΔP, so wird die Konstante K kleiner und zwar — bei Zugrundelegung der voranstehenden Zahlen — um 1%.

2 Ist der assimilatorische Quotient $\frac{x_{O_2}}{x_{CO_2}}$ nicht $= 1$, sondern $= \gamma$, so haben wir an Stelle Gleichung (9)

$$\frac{x_{O_2}}{x_{CO_2}} = \gamma$$

und erhalten statt Gleichung (11)

$$x_{O_2} = h \left[\frac{\left(\gamma k + \gamma \frac{v_F \alpha_2}{P_0}\right)\left(k + \frac{v_F \alpha_1}{P_0}\right)}{k(\gamma - 1) + \gamma \frac{v_F \alpha_2}{P_0} - \frac{v_F \alpha_1}{P_0}} \right] \qquad (12)$$

Nach den Bemerkungen zu Abschnitt III ist $\gamma = 1{,}1$ Berechnet man K — unter Zugrundelegung der voranstehenden Zahlen — mit $\gamma = 1{,}1$ nach Gleichung (12), so wird $K = 2{,}39$ oder um 4% kleiner, als mit $\gamma = 1$.

Beide Korrektionen fallen ins Gewicht und müssen an K angebracht werden.

Zu Abschnitt IX.

Chlorophyllgehalt der Algen. Wir zentrifugierten die Zellen zusammen, ersetzten die umgebende Salzlösung durch mehrmaliges Waschen auf der Zentrifuge durch destilliertes Wasser — was ohne Schädigung der Zellen möglich ist — und verwandten einen Teil der so erhaltenen Suspension zur Bestimmung der Trockensubstanz, den andern Teil extrahierten wir auf der Zentrifuge mit absolutem Methylalkohol, wobei der gesamte Farbstoff in kurzer Zeit in Lösung ging, während ein rein weißes Zellsediment zurückblieb.

Zur Bestimmung der in der Lösung vorhandenen Chlorophyllmenge verfuhren wir nach WILLSTAETTER und STOLL[1], indem wir die gelben Pigmente abtrennten und die Chlorophyllinkaliumlösung im Kolorimeter mit einer Lösung von bekanntem Chlorophyllinkaliumgehalt verglichen. Die Vergleichslösung stellten wir uns aus kristallisiertem Äthylchlorophyllid[1] her, das wir auf Rat von Professor KOLKWITZ-Dahlem aus Aegopodium podagraria (Giersch) gewannen. Hierbei

erwies es sich als zweckmäßig, das mit dem Alkohol vermischte Blattmehl (100 g Blattmehl mit 200 ccm 90 proz. Äthylalkohol) mindestens vier Tage bis zur Verarbeitung stehen zu lassen.

Einige Bestimmungen seien hier angeführt:

„*Tageslichtzellen*“ 164 mg Trockensubstanz enthielten 4,34 mg Chlorophyll oder 2,6%.

In 10 cm Entfernung von einer 75-Wattlampe gezüchtete Zellen. 111 mg Trockensubstanz enthielten 2,03 mg Chlorophyll oder 1,8%.

„*Schattenzellen*“ (75-Wattlampe, 32 cm). 120,6 mg Trockensubstanz enthielten 4,93 mg Chlorophyll oder 4,08%.

„*Schattenzellen*“ (75-Wattlampe 32 cm). 186,6 mg Trockensubstanz enthielten 7,40 mg Chlorophyll oder 3,96%.

Nach WILLSTAETTER und STOLL[2] liegt der Chlorophyllgehalt normaler Blätter zwischen 0,6 und 1,2%. Der Chlorophyllgehalt der Algen war also höher als der normaler Blätter.

---

[1] WILLSTAETTER u. STOLL: Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913.

[2] WILLSTAETTER u. STOLL: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, S. 3.

Zeitschr. f. physikalische Chemie **106**, 191. 1923.

Über den Einfluß der Wellenlänge auf den Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation.

Von

Otto Warburg und Erwin Negelein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 11. Juni 1923.)

Mit 4 Abbildungen.

In einer vorhergehenden Mitteilung[1] haben wir eine Anordnung beschrieben, nach der der Energieumsatz bei der Kohlensaureassimilation — die pro Kalorie absorbierter Strahlung gewonnene chemische Energie — in einfacher Weise gemessen werden kann Mit dieser Anordnung sind wir an das in der Überschrift genannte Problem herangegangen und haben den Energieumsatz im Rot, Gelb, Grün und Blau gemessen Die Spektralgebiete hierbei waren 610—690 $\mu\mu$, 578 $\mu\mu$, 546 $\mu\mu$ und 436 $\mu\mu$

Auch in einigen anderen Spektralgebieten haben wir Assimilationsversuche angestellt, so im Ultrarot zwischen 800 und 900 $\mu\mu$, im sichtbaren Rot zwischen 700 und 780 $\mu\mu$ und im Ultraviolett bei 366 $\mu\mu$ Im Ultrarot haben wir in keinem Fall eine Zersetzung von Kohlensaure beobachtet, gegenteilige Beobachtungen, die vorliegen, sind, wie wir annehmen müssen, unrichtig Im langwelligen Rot und im Ultraviolett wird Kohlensaure zersetzt, doch eignen sich diese Gebiete aus verschiedenen Grunden nicht fur quantitative Versuche

Wir behandeln unser Problem in folgenden Abschnitten·

I Die Versuche von BROWN und ESCOMBE und von anderen.
II Die Strahlungsquellen und die Isolierung der vier Spektralbezirke.
III Die Absorption der Algenfarbstoffe in den vier Spektralbezirken
IV Die Anordnung der Versuche
V. Die Zerstreuung und die Absorption in den Assimilationstrog.
VI Die Berechnung der Ausbeute
VII Resultate
VIII Diskussion der Resultate
IX. Experimentelle Einzelheiten.

[1] WARBURG, O. u. E. NEGELEIN· Zeitschr. f. physik. Chemie **102**, 235. 1922.

I. Die Versuche von Brown und Escombe und von anderen.

So viele wertvolle Arbeiten auch uber die Photochemie der Kohlensaureassimilation existieren, so findet sich unter ihnen doch keine, aus der der Energieumsatz berechnet werden kann Dies gilt auch von den ausgezeichneten und beruhmten Untersuchungen von Brown und Escombe[1], die Blatter mit Sonnenlicht von gemessener Intensitat bestrahlten und die zersetzten Kohlensauremengen bestimmten Hierbei gewannen sie etwa 4% der auffallenden Strahlungsenergie als chemische Energie

Doch kann aus den Versuchen von Brown und Escombe die absorbierte Strahlungsenergie nicht berechnet werden Bringt man namlich, wie Brown und Escombe es taten, zwischen Strahlungsquelle und Meßinstrument ein Blatt so laßt sich aus der Schwachung des Lichts die Absorption des Lichts nicht berechnen[2] Denn das Licht wird bei seinem Durchgang durch das Blatt zerstreut und das aus dem Blatt austretende Licht fallt großtenteils nicht in das Meßinstrument

Liegt nun auch von alteren Versuchen nichts vor was uber die absolute Große des Energieumsatzes Aufschluß gibt so kann man doch fragen, ob sich aus den Assimilationsversuchen in verschiedenfarbigem Licht — etwa aus den Versuchen von Draper[3] Pfeffer[3], Engelmann[4] Kniep und Minder[5], Wurmser[6] — nicht ein Urteil gewinnen laßt uber die Anderung des Energieumsatzes mit der Wellenlange

Zerlegt man das Licht einer Strahlungsquelle mit Hilfe von Prismen oder Filtern, so erhalt man verschiedenfarbiges Licht von im allgemeinen verschiedenen Intensitaten die fur zwei Spektralbezirke J_1 und J_2 sein mogen Bestrahlt man ein Objekt mit J_1 und J_2 in parallelem Licht sieht von der Zerstreuung ab und macht die weitere vereinfachende Annahme, daß die Intensitaten J_1 und J_2 sehr niedrig sind so ist das Verhaltnis der photochemischen Wirkungen W_1 und W_2

[1] Proc. of the roy soc of London, B 76, 29 1905

[2] Indem F Weigert (Zeitschr f wiss Phot 11 381 1912) aus den von Brown u Escombe angegebenen Schwachungswerten die Absorption des Lichtes berechnet, kommt er auf einen Ausnutzungsfaktor von nahezu 100% ein Wert den schon Engelmann (Botan Zeitung 42, 81 1884) auf Grund seiner mikroskopischen Beobachtungen als wahrscheinlich annahm Beide Schatzungen jedoch beruhen auf Voraussetzungen, die uns nicht zulassig zu sein scheinen

[3] Pfeffer Handbuch der Pflanzenphysiologie, Band I, Leipzig 1897

[4] Botan Zeitung, 40, 419 1882

[5] Zeitschr f Botanik 1, 619 1909.

[6] Recherches sur l'Assimilation Chlorophyllienne Paris J Hermann 1921.

$$\frac{W_1}{W_2} = \frac{J_1(1 - e^{-\alpha_1 d})\varphi_1}{J_2(1 - e^{-\alpha_2 d})\varphi_2} \qquad (1)$$

(α_1 und α_2 Absorptionskoeffizienten, φ_1 und φ_2 Energieumsätze in den Spektralbezirken 1 und 2, d Schichtdicke des Objekts in der Strahlenrichtung).

Das Verhältnis der beobachteten Wirkungen hängt also im allgemeinen von einer Reihe von Größen ab und nur wenn $J_1 = J_2$ und d groß, so daß $e^{-\alpha d}$ klein gegen 1 ist, wird

$$\frac{W_1}{W_2} = \frac{\varphi_1}{\varphi_2}, \qquad (2)$$

das heißt, das Verhältnis der Wirkungen ein Maß für die Energieumsätze in den verschiedenen Spektralbezirken.

Indessen erkennt man bei Durchsicht der vorliegenden Arbeiten leicht, daß die Bedingungen der Gleichung (2) in keinem Fall erfüllt waren. Entweder war weder $J_1 = J_2$, noch d hinreichend groß — wie in den Versuchen von DRAPER, PFEFFER, ENGELMANN — oder es war zwar die erste Bedingung erfüllt — wie in den Versuchen von KNIEP und MINDER — nicht aber die zweite[1].

Unter diesen Umständen wird es verständlich, daß die „Assimilationskurven" je nach der Strahlungsquelle, der Zerlegungsvorrichtung und der Objektdicke, verschieden aussehen. Und man wird in unseren Zahlen, wenn man sie mit diesen Kurven vergleicht, keinen Widerspruch zu älteren Beobachtungen sehen.

II. Die Strahlungsquellen und die Isolierung der vier Spektralbezirke.

Als Strahlungsquellen benutzten wir eine Quecksilberdampflampe aus Quarz von HERAEUS und eine Metallfadenlampe mit Stickstofffüllung, die von den Osramwerken angefertigt wurde[2].

Die Quecksilberlampe wurde mit 185 Volt 3.5 Ampere betrieben, ihre Strahlung mittels eines Regulierwiderstandes auf 1% konstant gehalten. Aus ihr isolierten wir die gelbe Linie ($578\,\mu\mu$), die grüne

[1] Gegenüber der Arbeit von WURMSER (loc. cit.) treffen diese Bemerkungen nicht zu. WURMSER hat versucht, die photochemische Wirkung verschiedener Farben auf die absorbierte Strahlung zu beziehen, doch ist das Problem, die absorbierte Energie zu messen, von WURMSER noch nicht gelöst worden. — In der Arbeit von WURMSER findet sich, worauf besonders hingewiesen sei, eine ausgezeichnete und sehr vollständige Literaturübersicht über die Photochemie des Assimilationsvorganges.

[2] Herrn Direktor Dr. MAY sprechen wir auch hier für sein Entgegenkommen unseren Dank aus.

Linie (546 $\mu\mu$) und eine blaue Linie (436 $\mu\mu$) mit Hilfe von Farblösungen, über deren Bereitung und Prüfung man in Abschnitt IX unter Ziffer 1 Näheres findet. Die Prüfung geschah photometrisch und bolometrisch.

Leider gibt es keine Möglichkeit, in ähnlicher Weise Rot hinreichend intensiv und rein zu gewinnen. Zwar kann man aus der Cadmiumamalgamlampe die Linie 644 $\mu\mu$ mittels roter Farbstoffe so isolieren, daß die Strahlung für das Auge fast monochromatisch erscheint, doch erweist sie sich bei spektralbolometrischer Prüfung als erheblich verunreinigt mit langwelligem, nur schwach sichtbarem Rot.

Wir waren so genötigt, uns Rot durch spektrale Zerlegung zu verschaffen. Der von der Firma Leiss, Berlin-Steglitz, angefertigte Monochromator bestand aus zwei Flintglasprismen von 75 × 75 mm brechender Fläche in Youngscher Anordnung montiert. Die freie Öffnung der Objektive war 70 mm, ihre Brennweite 245 mm. Die Dispersion (C—F) betrug 3 Grad 25 Min.

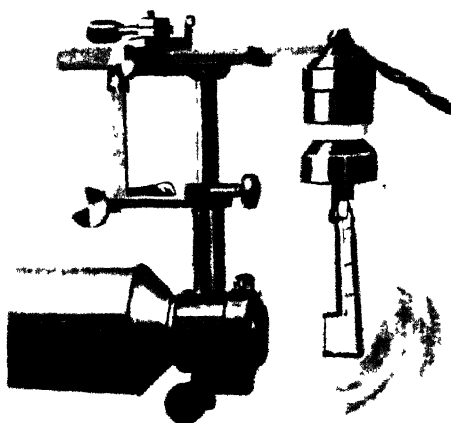



Abb. 1.

Selbst mit diesem recht leistungsfähigen Instrument war es zunächst schwierig, Rot in genügender Intensität zu erhalten. Nach vielen Versuchen blieben wir bei der Anordnung Abb. 1 stehen. Der leuchtende Spiralfaden einer Metallfadenlampe dient als Spalt. Der Faden ist [illegible] 1,5 cm lang, der Durchmesser einer Windung 1,5 mm. Ein System von drei Mikrometerschrauben hält die Lampe und ermöglicht es, den leuchtenden Faden in der Brennebene der Kollimatorlinse in die richtige Lage zu bringen. Da das Stellwerk der Lampe am Kollimatorrohr befestigt ist, so behält der einmal eingestellte leuchtende Faden seine Lage zur Kollimatorlinse auch bei Erschütterungen des Arbeitstisches bei.

Die Lampe wird mit 15 Volt 8,6 Ampere betrieben, ihre Strahlung mittels eines Regulierwiderstandes auf 1% konstant gehalten. Der benutzte Wellenlängenbezirk reicht von 610 bis 690 $\mu\mu$ bei einer Okularspaltweite von 1,7 mm, der Schwerpunkt liegt bei etwa 660 $\mu\mu$.

III. Die Absorption der Algenfarbstoffe in den vier Spektralbezirken.

Der Absorptionskoeffizient α eines Mediums ist definiert durch die Gleichung

$$-di = \alpha i dx, \tag{1}$$

wo $-di$ die Abnahme der Intensität i auf dem Weg dx bedeutet.

(1) ergibt integriert für den endlichen Weg d, auf dem die Intensität von i_0 bis i sinkt:

$$\alpha = \frac{1}{d} \ln \frac{i_0}{i}. \tag{2}$$

Wegen der Zerstreuung ist es nicht möglich, die Absorption der an die Zelle gebundenen Farbstoffe zu messen. Doch kann man die Farbstoffe mit einem passenden Lösungsmittel aus der Zelle extrahieren und die Absorptionskoeffizienten der klaren Farbstofflösung in den verschiedenen Spektralbezirken vergleichen. Unter der Voraussetzung, daß sich das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten durch die Extraktion nicht ändert, erhält man so ein Bild von den Absorptionsverhältnissen in der Zelle.

Wir extrahieren die Farbstoffe unseres Versuchsobjektes, der Alge Chlorella, mit Methylalkohol bei Zimmertemperatur und erhalten eine Lösung von Chlorophyll[1] ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ und $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) und den

Tabelle 1

$$\alpha = \frac{1}{d} \ln \frac{i_0}{i} = \frac{1}{d} \ln \frac{\operatorname{tg} \varphi_1}{\operatorname{tg} \varphi_2}.$$

Mittlere Wellenlänge $\mu\mu$	d cm	Beobachtete Winkel in Graden		α
		φ_1	φ_2	
690	1	40,0	35,8	1,51
670	1	54,1	23,5	1,16
650	1	48,8	27,0	0,807
630	1	43,6	31,6	0,437
610	2	48,4	27,3	0,389
590	2	44,4	30,5	0,253
570	2	41,8	32,7	0,166
550	2	40,1	33,8	0,115
530	2	39,4	34,4	0,092
510	2	39,0	34,0	0,092
490	1	43,8	29,6	0,522
480	1	52,5	24,2	1,06
470	1	58,6	18,8	1,57
436	1	71,5	11,8	2,67
405	1	63,1	17,3	1,84

[1] Willstaetter u. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913.

einfacher gebauten gelben Farbstoffen Caroten[1] ($C_{40}H_{56}$) und Xanthophyll[1] ($C_{40}H_{56}O_2$). Wir messen die Absorption mittels des König-Martensschen Spektralphotometers[2] für Schichtdicken von 1 und 2 cm und Farbstoffkonzentrationen, die bei Extraktion von 1 ccm Zellen (= 0,2 g Trockensubstanz) mit 1000 ccm Methylalkohol entstehen (Tabelle 1 und Abb. 2).

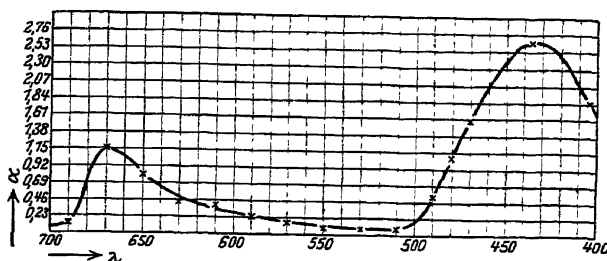



Abb 2

Aus Abb. 2 entnehmen wir die Absorptionskoeffizienten in den uns interessierenden Spektralbezirken:

Wellenlänge (μμ)	Absorptionskoeffizient
660	1,04
578	0,207
546	0,115
436	2,67

Die Absorptionskoeffizienten in unseren Versuchsbezirken sind also außerordentlich verschieden. α ist im Grün am kleinsten, im Gelb 1,8 mal so groß, im Rot 9 mal so groß, im Blau 23 mal so groß als im Grün. —

Wichtig für das Folgende ist weiterhin die Frage, in welchem Maße sich die gelben Farbstoffe an der Absorption beteiligen. Auch hier sind wir auf Messungen an den extrahierten Farbstoffen angewiesen, können also die gestellte Frage wiederum nur unter der Reserve beantworten, daß die Absorptionsverhältnisse durch die Extraktion nicht wesentlich geändert werden.

Die Versuchsanordnung ist einfach und benutzt Willstaetters Methode[3] zur Trennung der grünen und gelben Farbstoffe. Wir messen zunächst den Absorptionskoeffizienten α_1 eines methylalkoholischen Zellextraktes, nehmen dann aus dem Farbstoffgemisch das Chlorophyll

[1] Willstaetter u. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913.

[2] Martens, F. F. u. F. Grünbaum: Über eine Neukonstruktion des Königschen Spektralphotometers (Ann. Physik, 4. Folge, 12, 984, 1903).

[3] Willstaetter u. Stoll: loc. cit.

durch Verseifung heraus, bringen die gelben Farbstoffe in Methylalkohol auf ihre Konzentration im Zellextrakt und messen den Absorptionskoeffizienten a_2 der gelben Lösung. $\frac{a_2}{a_1}$ ist dann der Bruchteil der Strahlung, der in dem Gemisch von den gelben Farbstoffen absorbiert wird.

Wie es scheint, ist dieses Verfahren insofern korrekt, als die grünen und gelben Farbstoffe, in Methylalkohol gelöst, sich in ihrer Absorption gegenseitig nicht beeinflussen. Denn löst man kristallisiertes Chlorophyll (Äthylchlorophyllid) in gleichen Volumina von Methylalkohol oder einer methylalkoholischen Lösung der gelben Farbstoffe, so nimmt der Absorptionskoeffizient in beiden Fällen um den gleichen Betrag zu.

Eine Versuchsreihe ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Extraktkonzentration ist die oben angegebene. Die in der ersten Spalte verzeichneten Wellenlängen sind Linien einer Cadmiumamalgamlampe, mit der das König-Martenssche Photometer beleuchtet wurde. In der letzten Spalte stehen die Quotienten $\frac{a_2}{a_1}$, die im Rot, Gelb und Grün, wo die gelben Farbstoffe nicht absorbieren, Null sind. Im Blaugrün ist der von gelben Farbstoffen absorbierte Anteil — mit etwa 46% — am größten, im Blau ist er rund 30%.

Tabelle 2

$$\alpha = \frac{1}{d} \ln \frac{\operatorname{tg} \varphi_1}{\operatorname{tg} \varphi_2}$$

Wellenlänge $\mu\mu$	d cm	Gemisch			Gelbe Farbstoffe			$\frac{\alpha_2}{\alpha_1}$ in %
		Beobachtete Winkel		α_1	Beobachtete Winkel		α_2	
		φ_1	φ_2		φ_1	φ_2		
644	1	36,8	23,7	0,535	Innerhalb der		—	0
578	2	31,5	21,4	0,223	Fehlergrenzen		—	0
546	2	27,8	22,9	0,110	gleich		—	0
480	1	42,5	17,4	1,06	37,4	25,5	0,472	45
468	1	48,3	14,3	1,48	40,8	23,5	0,690	47
436	1	63,3	7,3	2,73	42,0	21,3	0,840	31
405	1	52,2	10,4	1,94	37,3	23,7	0,550	28

IV. Die Anordnung der Versuche

ist in Abb. 3 abgebildet. Die von der Quecksilberlampe Hg ausgehende Strahlung passiert eine Reihe von kreisförmigen Blenden b, wird durch die Linse L_1 parallel gemacht, tritt durch die Irisblende I_1, die Farbtröge F, die Irisblende I_2, die Linse L_2 und wird schließlich durch

den Spiegel S_2 in den Assimilationstrog T geworfen. Die in dem Trog T auftretende Druckänderung wird von dem BARCROFTschen Differentialmanometer M angezeigt und mittels des Kathetometer-Doppelmiskroskops K (in der Abbildung ist nur eine Säule ein Mikroskop zu sehen) abgelesen. Zwei Beobachter sind zur Ablesung nötig, von denen jeder mit seinem Mikroskop dem Meniskus der Sperrflüssigkeit folgt und beim Ablesen sein Fadenkreuz mit der Tangente des Meniskus zur Deckung bringt.

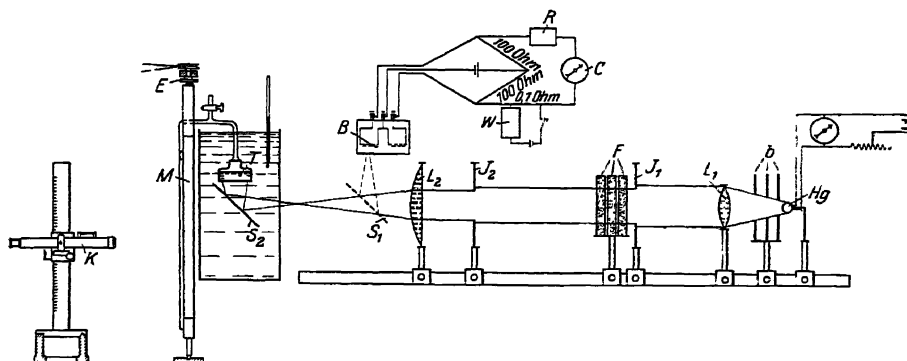



Abb. 3

Die Bestrahlungszeit beträgt 10 Minuten. Ist sie abgelaufen, so wird der Assimilationstrog durch den Spiegel S_1 verdunkelt, der die Strahlung auf die Platinstreifen des Bolometers B wirft. Die Verdunkelungszeit beträgt 10 Minuten, nämlich 5 Minuten bis zur Ablesung der photochemischen Wirkung und 5 Minuten zur Atmungsmessung. Jeder Wechsel der Versuchsbedingungen — Übergang zu einer anderen Intensität oder Farbe — bedingt eine Änderung der Atmung. Da eine Messung der Assimilation nur möglich ist, wenn die Atmung vor und nach der Bestrahlung gleich ist, so wird nach jedem Übergang vor die Meßperiode eine „Vorperiode" gelegt.

Der Wechsel der Spektralbezirke nimmt etwa eine Minute in Anspruch und wird in der Dunkelzeit, während einer Atmungsmessung, vollzogen. Der Wechsel zwischen Gelb, Grün und Blau erfordert lediglich eine Umstellung von Farbtrogen. Der Übergang zu Rot geschieht durch Einschalten eines Planspiegels zwischen die Farbtroge F und die Irisblende I_2, der das Licht der Quecksilberlampe abblendet und das aus dem Okularspalt des in der Abbildung nicht gezeichneten Monochromators austretende Licht auf S_1 oder S_2 wirft.

Auf dem Weg von der Linse L_2 bis zum Bolometer B wird die Strahlung in anderer Weise — und zwar weniger — geschwächt, als auf dem

Weg von der Linse L_2 zum Assimilationstrog T. Indem man bei konstanter Intensität der Strahlungsquelle das Bolometer einmal an Stelle von T und dann, wie in der Abbildung gezeichnet, montiert und an beiden Stellen die Strahlung mißt, erhält man einen für jeden Spektralbezirk verschiedenen Faktor, durch den die bei B gemessenen Werte auf die Stelle T reduziert werden können.

Die Strahlungsmessung geschieht in der früher beschriebenen Weise nach dem Kompensationsverfahren[1]. Die von den Platinstreifen des Bolometers eingenommene Fläche ist 10 qcm, die „nutzbare" Bolometerfläche, innerhalb deren die bestrahlte Fläche liegen muß, etwa 3 qcm. Eine merkliche Vergrößerung der bestrahlten Fläche darf keinen Einfluß auf den Galvanometerausschlag haben, eine Kontrolle, die durch Verschieben der Linse L_2 leicht angestellt werden kann.

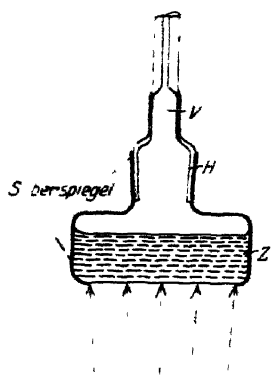



Abb. 4.

Die Assimilationsmessung geschieht in der früher beschriebenen Weise. Zu achten ist auf die Bedingung, daß die Zellsuspension mit den Gasen des Gasraumes in jedem Augenblick nahezu praktisch im Absorptionsgleichgewicht ist, daß also die Schüttelgeschwindigkeit ausreicht. Ist dies der Fall, so hat eine Vergrößerung der Schüttelgeschwindigkeit keinen Einfluß auf die Ausschläge am Manometer — eine notwendige und leicht auszuführende Kontrolle.

Die Form des Assimilationstroges zeigt Abb. 4. Die Grundfläche des Troges ist 23 qcm, die bestrahlte Fläche etwa 17 qcm, die Höhe der Zellsuspension Z bei ruhendem Trog 1,6 cm, bei bewegtem Trog an keiner Stelle kleiner als 1 cm. Die Seitenwände sind außen versilbert und zum Schutz des Silberspiegels verkupfert. Praktisch wichtig ist die veränderte Form des Helms H, der durch Vermittlung eines verjüngten Zwischenstückes V in die Manometerkapillare übergeht. Das Zwischenstück verhindert, daß die beim Schütteln hochspritzenden Flüssigkeitstropfen die Capillare erreichen, was eine Unterbrechung des Versuches bedeuten würde.

V. Die Zerstreuung und die Absorption in dem Assimilationstrog

Die in den Assimilationstrog eintretende Strahlung wird zum Teil von der farblosen Zwischenflüssigkeit durchgelassen, zum Teil, sofern

[1] Warburg, E., G. Leithäuser, E. Hupka u. C. Müller: Ann. d. Physik, 4. Folge. 40, 609. 1913.

sie auf Zellen trifft, absorbiert oder zerstreut. Das durchgelassene und zerstreute Licht wird zum Teil von dem Silberspiegel der Trogwände in die Zellsuspension zurückgeworfen, der Rest verlaßt den Trog durch den Helm und den Boden und ist bei der Berechnung von dem eingestrahlten Licht abzuziehen.

Das Licht, das durch den Boden des Assimilationstroges wieder austritt, kann in einfacher Weise, nach einer in der Photometrie gebrauchlichen Methode, gemessen werden Wir füllen den Trog, wie zum Assimilationsversuch, mit Zellsuspension, bedecken den Boden zur Halfte mit einem durch Magnesiumoxyd geweißten Blechstreifen und bestrahlen beide Halften mit parallelem Licht gleicher Intensitat. Betrachten wir den Boden des Troges von der Seite, so erscheint das mit Magnesiumoxyd bedeckte Feld hell, das andere Feld dunkel. Nimmt man an — was erlaubt ist —, daß das Magnesiumoxyd alles auffallende Licht zerstreut, so ergibt das Helligkeitsverhältnis beider Felder den gesuchten Zerstreuungsverlust.

Um dieses Verhaltnis zu bestimmen, verdunkeln wir durch Rauchglaser, die in geeigneter Weise in den Strahlengang eingeschaltet werden, das helle Feld so weit, daß es dem dunkeln gleich erscheint Ist die Durchlassigkeit der hierzu erforderlichen Rauchglaskombination β — β wird bolometrisch gemessen —, so ist β der Bruchteil der Strahlung, der als zerstreutes Licht durch den Boden des Assimilationstroges wieder austritt

β hangt ab sowohl von der Dichte der Zellsuspension, als auch von der Farbe des eingestrahlten Lichtes, und zwar ist der Zerstreuungsverlust großer fur Wellenlangen, die schwach absorbiert werden, als fur Wellenlangen, die stark absorbiert werden Denn je starker die Absorption, um so weniger Zellen werden auf dem Absorptionsweg getroffen

Wir wahlen fur die Zerstreuungsmessungen die Zelldichte der Assimilationsversuche — 2 ccm Zellen (= 0 4 g Trockensubstanz) 100 ccm — und finden.

Fur die Wellenlangen ($\mu\mu$)	β
610—690	kleiner als 0,005
578	„ „ 0,005
546	0,005
436	kleiner als 0,005

Im Rot, Gelb und Blau ist β so klein, daß wir nur eine obere Grenze angeben konnen, im Grun, dem Gebiet der schwachsten Absorption, ist β etwa 0,5%, also auch hier für unsere Rechnungen zu vernachlassigen.

Schwieriger ist die Messung der Strahlung, die aus dem Helm des Assimilationstroges austritt. Um sie zu umgehen, arbeiten wir mit vollständiger Absorption, das heißt, wir füllen eine so dichte Zellsuspension in den Trog ein, daß die durch den Helm austretende Strahlung zu vernachlässigen ist. Ob dies tatsächlich der Fall ist, muß für jede Anordnung geprüft werden, und zwar verfahren wir in folgender Weise:

Wir messen die photochemische Wirkung einer bestimmten Menge eingestrahlter Energie bei zwei verschiedenen Zelldichten 1 und 2, von denen 2 doppelt so groß ist wie 1. Ist die Absorption bei der Zelldichte 1 vollständig, so ist die photochemische Wirkung bei 1 und 2 gleich, die Ausschläge sind unabhängig von den Zelldichten.

Indessen genügt diese Kontrolle nicht. Ist die Absorption unvollständig, so wird zwar eine Vermehrung der Zelldichte im allgemeinen einen Anstieg der Wirkung zur Folge haben, immer dann, wenn die angewandte Strahlung monochromatisch ist. Hat man es jedoch mit einem Gemisch von Wellenlängen zu tun, so kann ein Teil, der stark absorbiert wird, bei beiden Zelldichten fast vollständig durchgehen. Die Wirkung wird also bei einer Vermehrung der Zelldichte — trotz unvollständiger Absorption — nicht steigen. Dieser Fall war realisiert bei unseren Vorversuchen im Rot. Der angewandte Spektralbezirk reichte von 660—710 $\mu\mu$ und enthielt neben Wellenlängen, die sehr stark absorbiert werden, 660—690 $\mu\mu$, solche, die sehr schwach absorbiert werden 690—710 $\mu\mu$. Trotz der Kontrolle mit verschiedenen Zelldichten war die Absorption, wie wir durch die nachstehende zweite Kontrolle feststellen konnten, unvollständig, und die Ausbeute im Rot wurde zu klein berechnet. Unsere Bemerkung, das Maximum der Wirkung scheine im Gelb zu liegen[1], ist auf Grund dieses nunmehr aufgeklärten Irrtums entstanden.

Was die zweite Kontrolle[2] betrifft, so messen wir die Absorption des methylalkoholischen Zellextraktes in den vier Versuchsspektral-

[1] Vgl. Zeitschr. f. physik. Chemie 102, 246. 1922, wo der zweite Absatz des Abschnittes VIII als falsch zu streichen ist.

[2] Gegen die zweite Kontrolle kann eingewendet werden, daß die Absorptionsverhältnisse der Farbstoffe sich durch die Extraktion ändern. Dieser Einwand ist an sich richtig, aber nicht sehr schwerwiegend. Der wesentlichste Unterschied zwischen den Absorptionsspektren der Zelle und des Extrakts betrifft die rote Chlorophyllbande, die weiter in das langwellige Gebiet hineinragt, wenn das Chlorophyll in der Zelle gebunden, als wenn es in Methylalkohol gelöst ist. Nun ist das von dem Extrakt in unserem roten Spektralbezirk durchgelassene Licht im wesentlichen der langwelligste Teil des Bezirks. Sind die Farbstoffe an die Zelle gebunden, so ist die Absorption gerade in diesem Gebiet stärker; oder absorbieren die Farbstoffe, in Methylalkohol gelöst, bei 610—690 $\mu\mu$ vollständig, so absorbieren sie, an die Zelle gebunden, a fortiori vollständig.

bezirken bolometrisch. Die Extraktkonzentration wählen wir hierbei der Versuchszelldichte entsprechend, das heißt, wir extrahieren 2 ccm Zellen (= 0,4 g Trockensubstanz) mit 100 ccm Methylalkohol, so daß auf 1 Volumen Extrakt dieselbe Menge Farbstoff kommt, wie auf 1 Volumen Zellsuspension beim Versuch. Die Schichtdicke wahlen wir entsprechend dem tiefsten Stand der Zellsuspension im bewegten Trog, das heißt, gleich 1 cm, bringen also eine 1 cm tiefe, mit Extrakt gefüllte Kuvette in den Strahlengang zwischen die Farbtröge F und die Linse L_2 (Abb. 3). Dabei beobachten wir folgendes:

Wellenlänge $\mu\mu$	Galvanometerausschläge (Skalenteile)		Durchlässigkeit in %
	Kuvette mit reinem Methylalkohol	Kuvette mit Extrakt	
610—690	32	1	3
578	30	1	3
546	32	3	10
436	21	kleiner als 0,2	kleiner als 1

Viel geringer wird die Durchlassigkeit einer Zellsuspension gleicher Tiefe und Farbstoffdichte sein, weil das Licht die Zellsuspension nicht geradlinig, sondern im Zickzack durchsetzt, der Absorptionsweg mithin ein Mehrfaches von 1 cm ist Auch ist zu bedenken, daß der Silberspiegel der Trogwande einen Teil des durchgelassenen Lichtes wieder in die Suspension zuruckwirft.

Auf Grund dieser Überlegungen und der obenstehenden Zahlen wird man die Durchlassigkeit im Rot, Gelb und Blau vernachlassigen konnen, im Grun mit einigen Prozenten jedenfalls nicht zu niedrig schatzen

VI. Die Berechnung der Ausbeute.

Die Großen, deren wir zur Berechnung der Ausbeute bedurfen sind die absorbierte Strahlungsenergie E und die photochemische Wirkung W Die Großen, die wir nach dem vorhergehenden messen, sind der Widerstand ω im Kompensationskreis der Bolometerschaltung und die Niveauanderung ΔH der Manometerschenkel Das Folgende erlautert die Berechnung von E aus ω und von W aus ΔH

Berechnung von E aus ω.

Wir eichen das Bolometer, indem wir vor die Platinstreifen des Bolometers eine Blende von 2,75 qcm bringen und die Hefnerlampe 1 m von der Blende entfernt aufstellen. Zwischen Hefnerlampe und Bolometer stehen die drei Gerlachschen Blenden.

Nach GERLACH[1] strahlt die Hefnerlampe pro Sekunde auf 1 qcm einer 1 m entfernten Fläche $22{,}6 \cdot 10^{-6}$ cal, mithin auf die Platinstreifen unseres Bolometers bei der Eichung $2{,}75 \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6}$ cal. Hierbei finden wir den Kompensationswiderstand, der das Galvanometer in die Nullstellung zurückbringt, gleich 11400 Ohm, bei einer Temperatur von 15° und den Akkumulatorenspannungen von 2,01 Volt.

Daraus ergibt sich die pro Sekunde auf die Streifen fallende Energie, wenn der Kompensationswiderstand ω gefunden wird:

$$e = 2{,}75 \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6} \frac{11400}{\omega},$$

wenn die Temperatur des Arbeitsraumes und die Akkumulatorenspannungen die gleichen sind, wie bei der Eichung.

Beim Versuch sind die Platinstreifen des Bolometers durch ein Quarzfenster geschützt. Das Bolometer befindet sich an der Stelle des Assimilationstroges T, das Thermostatenwasser reicht bis nahe an das Quarzfenster heran, ohne dasselbe zu berühren. Der bei Bestrahlung zur Kompensation erforderliche Widerstand, auf die Eichungsbedingungen reduziert, sei ω. Dann ist die pro Sekunde in den Assimilationstrog eingestrahlte Energie

$$e_{\text{corr}} = 1{,}1 \cdot 2{,}75 \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6} \frac{11400}{\omega},$$

die in den Assimilationstrog eingestrahlte Energie also 1,1 mal so groß, als die auf die Platinstreifen des Bolometers fallende Energie. (Der Korrektionsfaktor 1,1 entsteht durch Berücksichtigung der verschiedenen Reflexionen, die die Strahlung auf dem Weg zu den Bolometerstreifen einerseits, zum Assimilationstrog andererseits erleidet, worüber man näheres in unserer früheren Arbeit[2] findet. Über die Reduktion von ω auf die Eichungsbedingungen vgl. Abschnitt IX, Ziffer 2 dieser Arbeit.)

Ist die Bestrahlungszeit t Sekunden, so werden $e \cdot t$ cal in den Trog eingestrahlt, ebenso groß ist die absorbierte Energie, die nach Abschnitt V der eingestrahlten gleichgesetzt werden darf. Wir erhalten so die gesuchte Größe E, die in der Bestrahlungszeit absorbierte Energie

$$E = 1{,}1 \cdot 2{,}75 \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6} \frac{11400}{\omega} \cdot t\,[\text{cal}]$$

Bei einer Bestrahlungszeit von 600 Sekunden war E in der Mehrzahl unserer Versuche 0,2—0,4. Im Mittel 0,3 cal also trafen in 600

[1] Physikal. Zeitschr. 14, 577. 1903.
[2] Zeitschr. f. physik. Chemie 102, 256. 1922.

Sekunden den Boden des Assimilationstroges auf einer Fläche von 17 qcm, woraus die mittlere Intensität der Strahlung an der Eintrittsstelle

$$i_0 = \frac{0,3}{600 \cdot 17} = 3 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{cal}}{\text{qcm} \cdot \text{Sek.}}\right]$$

gefunden wird.

Was die Genauigkeit bei der Messung von E anbetrifft, so wird ω und damit auch E mit einem Fehler von etwa 1% erhalten.

Berechnung von W aus ΔH.

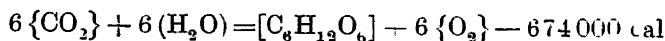
Aus den Abmessungen des Differentialmanometers und des Assimilationstroges (Abschnitt IX, Ziffer 3 dieser Arbeit) wird die Gefäßkonstante K berechnet. K bedeutet die Kubikmillimeter entwickelten Sauerstoffs, die durch eine Niveauänderung von 1 mm angezeigt werden und war in allen Versuchen 2,34. Beträgt also die Niveauänderung in der Bestrahlungszeit ΔH mm, so ist

$$W[\text{cmm}] = \Delta H \cdot K.$$

Aus W[cmm] erhält man W[Mole] oder W[cal] durch die Beziehungen

$$W[\text{Mole}] = 4,48 \cdot 10^{-8} \cdot W[\text{cmm}] \quad \text{und} \quad W[\text{cal}] = 5,03 \cdot 10^{-3} \cdot W[\text{cmm}].$$

Der Umrechnung in cal liegt die Annahme zugrunde, daß die Energiegleichung der Kohlensäureassimilation lautet

$$6\{CO_2\} + 6(H_2O) = [C_6H_{12}O_6] + 6\{O_2\} - 674000 \text{ cal}$$

Der Fehler bei der Messung von ΔH beträgt 2—3%. W[cmm] und W[Mole] werden also mit einer Genauigkeit von 2—3% erhalten. Weniger sicher ist der Wert von W[cal], da bei seiner Berechnung die Gültigkeit der Assimilationsgleichung vorausgesetzt wird.

Berechnung der Ausbeute.

Das Verhältnis $\frac{W}{E}$ — die von einer Kalorie absorbierter Strahlung hervorgebrachte chemische Wirkung — das wir nach E. Warburg[1] als φ bezeichnen, hängt bei der Kohlensäureassimilation von der Intensität der angewandten Strahlung ab. φ wird mit wachsender Intensität kleiner und nähert sich mit sinkender Intensität einem Grenzwert φ_0, den wir als die „Ausbeute" bei der Kohlensäureassimilation bezeichnen.

[1] Quantentheoretische Grundlagen der Photochemie, Zeitschr. f. Elektrochemie **26**, 54. 1920.

Um φ_0 zu finden, haben wir früher zwei φ-Werte bei zwei Intensitäten gemessen und dann φ_0 durch Extrapolation auf die Intensität Null berechnet. Da jedoch der Verlauf der φ-Kurve unbekannt ist, so haben wir die Berechnung der Ausbeute durch Extrapolation aufgegeben. Wir messen φ nunmehr bei möglichst niedrigen Intensitäten. Ändert sich φ in dem Gebiet, in dem wir messen, mit der Intensität nicht erheblich, so betrachten wir den bei der niedrigsten Intensität gemessenen Wert als die Ausbeute φ_0.

Wir finden so die Ausbeute niedriger, als sie vielleicht ist, und niedriger, als sie in der früheren Arbeit durch Extrapolation berechnet wurde. Dem Mittelwert von 70%, der früher durch Berechnung erhalten wurde, steht jetzt — im Rot — ein gemessener Mittelwert von 59% und ein gemessener Höchstwert von 63,5% gegenüber.

VII. Resultate.

Da die Ausbeute einer Algenkultur verschieden gefunden wird je nach den Bedingungen, unter denen die Kultur entstanden ist — worüber in unserer früheren Arbeit ausführlich berichtet ist — so sollten für vergleichende Versuche möglichst gleichartig gezüchtete Zellen verwendet werden.

Den Chlorellastamm, mit dem wir arbeiten, züchten wir seit $4^1/_2$ Jahren im Laboratorium. Kulturen, die hohe Ausbeuten geben, entstehen, wenn man hellgezüchtete Zellen einige Zeit bei niedriger Lichtstärke weiterwachsen läßt. Nur derartige Zellen haben wir für unsere Messungen benutzt, von denen wir eine vollständige zwischen dem 1. März und 23. April dieses Jahres beobachtete Reihe in den Tabellen 3—6 wiedergeben. Wie weit es uns gelungen ist, unser Material gleichartig zu züchten, ergibt sich am besten durch Vergleich der in einem bestimmten Spektralbezirk gefundenen Ausbeuten.

Die Versuchsreihe ergibt folgende Mittelwerte für φ_0

Wellenlänge $\mu\mu$	$\varphi_0 \left[\frac{cm^3}{cal}\right]$
660	117
578	106
436	67

das heißt, die Ausbeute nimmt mit sinkender Wellenlänge ab. Der Wert von 88 für φ_0 im Grün ordnet sich in diese Regel ein, selbst wenn wir in diesem Spektralbezirk mit einer Unsicherheit von 10%, die nach Abschnitt V zu hoch geschätzt ist, rechnen. Weil wir jedoch der voll-

ständigen Absorption im Grün nicht sicher sind, haben wir uns hier mit einem, mehr orientierenden Versuch begnügt.

Die Ausbeuten im Rot und Blau liegen weit auseinander. φ_0 im Rot ist in jedem Fall größer als im Blau, welche der verschiedenen Einzelversuche wir auch vergleichen. Denn der niedrigste Wert im Rot ist 113, der höchste Wert im Blau 73.

Anders fällt ein Vergleich der Einzelversuche im Rot und Gelb aus. Der höchste Wert im Gelb ist 121, also größer, als der niedrigste

Tabelle 3. *Rot.* $\lambda = 610$—$690\ \mu\mu$. *Schwerpunkt etwa 660* $\mu\mu$.

Nr.	Datum	ω Ohm	E cal	ΔH mm	W cmm	φ_0 $\frac{\text{cmm}}{\text{cal}}$	φ_0 $\frac{\text{cal}}{\text{cal}}$ 100
1	1. 3	2350	0,204	10,25	24,2	118	59,8
2	6. 3	2690	0,179	8,59	20,2	113	57,1
3	7 3	1320	0,364	17,66	41,4	114	57,2
4	9. 3.	2300	0,208	10,30	24,2	116	58,2
5	16 4	2620	0,184	9,35	21,9	120	60,0
6	17. 4	2490	0,193	10,36	24,3	126	63,5
7	18 4	2470	0,194	9,35	21,9	113	57,0
8	19. 4	1260	0,382	18,26	43,0	113	57,0
9	23 4	2600	0,184	9,25	21,7	118	59,4
				Mittelwert von φ_0.		**116,8**	**59**

Tabelle 4 *Gelb.* $\lambda = 578\ \mu\mu$

Nr.	Datum	ω Ohm	E cal	ΔH mm	W cmm	φ_0 $\frac{\text{cmm}}{\text{cal}}$	φ_0 $\frac{\text{cal}}{\text{cal}}$ 100
1	12 3	1030	0,466	20,4	47,6	102	51,6
2	14 3	1960	0,245	10,7	25,1	102	51,6
3	15 3	1960	0,245	10,91	25,6	104	52,6
4	20 3	1080	0,444	19,66	46,2	104	52,6
5	22 3	1120	0,430	19,2	45,0	104	52,8
6	23 3	570	0,843	36,45	85,8	102	51,3
7	31 3	1280	0,376	16,06	37,7	100	50,3
8	5 4	1080	0,444	20,76	48,8	110	55,4
9	6. 4	1100	0,436	19,30	45,5	104	52,5
10	7 4	1085	0,440	21,66	50,8	116	58,2
11	9. 4	1100	0,435	19,85	46,7	107	54,1
12	10 4	1100	0,436	19,66	46,2	106	53,2
13	11. 4	1120	0,429	20,30	47,5	111	55,9
14	12 4	2080	0,232	12,01	28,0	121	61,0
15	17. 4.	2080	0,232	10,31	24,2	104	52,7
16	18. 4	1180	0,407	17,65	41,5	102	51,4
17	19. 4	1160	0,414	18,70	43,8	106	53,2
18	23. 4	1220	0,393	17,51	41,0	104	52,7
				Mittelwert von φ_0:		**106**	**53,5**

Tabelle 5 *Grün* $\lambda = 546\ \mu\mu$

Nr.	Datum	ω Ohm	E cal	ΔH mm	W cmm	φ_0 $\frac{\text{cmm}}{\text{cal}}$	φ_0 $\frac{\text{cal}}{\text{cal}} \cdot 100$
1	31. 3.	1160	0,414	15,55	36,5	88,3	44,4

Tabelle 6 *Blau.* $\lambda = 436\ \mu\mu$.

Nr.	Datum	ω Ohm	E cal	ΔH mm	W cmm	φ_0 $\frac{\text{cmm}}{\text{cal}}$	φ_0 $\frac{\text{cal}}{\text{cal}} \cdot 100$
1	12. 3.	1620	0,296	8,65	20,3	68,7	34,5
2	14. 3.	1720	0,280	7,56	17,8	63,8	32,2
3	15. 3.	1720	0,280	8,39	19,7	70,3	35,4
4	17. 3.	1500	0,320	7,81	18,4	57,5	29,0
5	20. 3.	1790	0,269	7,91	18,6	69,0	34,8
6	22. 3.	1540	0,312	9,05	21,2	68,0	34,3
7	5. 4	3430	0,140	3,90	9,15	65,3	32,9
8	6. 4.	1580	0,304	9,41	22,1	72,8	36,6
9	11. 4.	1620	0,296	8,65	20,3	68,9	34,6
10	12. 4.	1620	0,296	8,30	19,4	65,7	33,0
				Mittelwert von φ_0		**67,0**	**33,8**

Wert im Rot, 113. Hier gibt der Vergleich von Einzelversuchen unter Umständen ein falsches Bild

Von den individuellen und unvermeidbaren Unterschieden der Kulturen machen wir uns frei, wenn wir Ausbeuten, die für ein und dieselbe Kultur gemessen sind, vergleichen Versuche, die dieser Bedingung genügen, befinden sich unter den oben mitgeteilten. Wir haben sie aus den Tabellen 3—6 ausgezogen und in den Tabellen 7 und 8 zusammengestellt

Um das Verhältnis der Ausbeuten in den verschiedenen Spektralbezirken, die Quotienten $\frac{\varphi_{660}}{\varphi_{578}}$ und $\frac{\varphi_{578}}{\varphi_{436}}$ zu berechnen, benutzt man entweder die Tabellen 3—6 und dividiert die Mittelwerte von φ durcheinander, oder man bedient sich, was sachgemäßer ist, der Tabellen 7 und 8 und bildet die Mittelwerte der aus den Einzelversuchen berechneten Quotienten Man erhält so.

Quotient	Durch Division der mittleren Ausbeuten nach Tab. 3 bis 6	Mittelwerte der Quotienten nach Tab. 7 und 8
$\frac{\varphi_{660}}{\varphi_{578}}$	1,10	**1,13**
$\frac{\varphi_{578}}{\varphi_{436}}$	1,58	**1,55**

Tabelle 7. *Vergleich von Gelb und Blau.*

Datum	Wellenlänge $\mu\mu$	E cal	W cmm	φ_0 $\frac{cmm}{cal}$	$\frac{\varphi_{578}}{\varphi_{436}}$
12. 3.	578 436	0,466 0,296	47,6 20,3	102 68,8	1,49
14. 3.	578 436	0,245 0,279	25,1 17,8	102 63,8	1,60
15. 3	578 436	0,245 0,280	25,6 19,7	104 70,3	1,48
20. 3	578 436	0,444 0,269	46,2 18,6	104 69,0	1,51
5. 4.	578 436	0,444 0,140	48,8 9,15	110 65,3	1,68
6 4	578 436	0,437 0,304	47,4 22,1	108 72,8	1,49
11. 4	578 436	0,429 0,296	47,5 20,3	111 68,8	1,62
				Mittel	**1,55**

Tabelle 8. *Vergleich von Rot und Gelb.*

Datum	Wellenlange $\mu\mu$	E cal	W cmm	φ_0 $\frac{cmm}{cal}$	$\frac{\varphi_{660}}{\varphi_{578}}$
17 4	660 578	0,193 0,232	24,3 24,2	126 104	1,21
18 4	660 578	0,194 0,407	21,9 41,5	113 102	1,09
19 4	660 578	0,382 0,414	43,0 43,8	113 106	1,07
23 4	660 578	0,184 0,393	21,7 41,0	118 104	1,13
				Mittel	**1,13**

VIII. Diskussion der Resultate.

Das Resultat unserer Versuche ist, daß die Ausbeute bei der Kohlensaureassimilation mit abnehmender Wellenlange — in der Richtung von Rot nach Blau — abnimmt Irgendeine Beziehung zu den Absorptionsbanden ist nicht zu erkennen, die Ausbeute im Rot, einem Gebiet starker Absorption, ist großer als im Grun, einem Gebiet sehr schwacher Absorption, und im Grün großer als im Blau, dem Gebiet stärkster Absorption. —

Bekanntlich sieht die Quantentheorie eine Abnahme der photochemischen Ausbeute mit abnehmender Wellenlänge voraus (Photochemisches Äquivalentgesetz von EINSTEIN) und hat EMIL WARBURG diese Abnahme in dem von der Theorie verlangten Maße bei der Photolyse der Brom- und Jodwasserstoffsäure gefunden[1]. Es liegt nahe, den Gang der Ausbeute mit der Wellenlänge auch in unserem Fall durch die Quantentheorie zu erklären.

Da ein Quantum in keinem unserer Spektralbezirke ausreicht, um ein Molekül Kohlensäure zu zerlegen, so ist der Ansatz

$$n = \frac{Q}{h\nu}$$

von vornherein auszuschließen, wenn wir unter n die Zahl der zerlegten Kohlensäuremoleküle, unter Q die absorbierte Strahlungsenergie verstehen. Wohl aber wäre möglich

$$n = k\frac{Q}{h\nu} \tag{1}$$

(k ein Proportionalitätsfaktor), ein Ansatz, der besagt: die Zahl der zerlegten Kohlensäuremoleküle ist proportional der Zahl der absorbierten Quanten, und der die Annahme einschließt, daß jedes absorbierte Quantum dieselbe chemische Wirkung hervorbringt.

Aus (1) folgt für zwei verschiedene Spektralbezirke 1 und 2

$$\frac{\varphi_1}{\varphi_2} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2}$$

eine Beziehung, die für Rot und Gelb nahezu erfüllt ist. Denn wir finden

$$\frac{\varphi_{660}}{\varphi_{578}} = 1{,}13\,, \quad \text{während} \quad \frac{660}{578} = 1{,}14\,.$$

Dagegen ist die Ausbeute im Blau kleiner, als Gleichung (1) voraussieht, denn wir finden

$$\frac{\varphi_{578}}{\varphi_{436}} = 1{,}55\,, \quad \text{während} \quad \frac{578}{436} = 1{,}32\,.$$

Die Abweichung im Blau, die nicht sehr erheblich, aber doch weit außerhalb der Fehlergrenzen ist, erklären wir folgendermaßen: Im Rot und Gelb absorbiert nur das Chlorophyll, im Blau absorbieren

[1] WARBURG, E.: Quantentheoretische Grundlagen der Photochemie (Zeitschr. f. Elektrochemie 26, 54. 1920).

neben dem Chlorophyll auch die gelben Farbstoffe. Man kann nun zwar annehmen, daß die Primärvorgänge im Rot und Gelb dieselben sind, aber es ist sicher, daß die Primärvorgänge im Blau zum Teil andere sind, als im Rot und Gelb.

In diesem Zusammenhang wäre dann zu denken, für Q in Gleichung (1) an Stelle der gesamten nur die vom Chlorophyll absorbierte Energie einzusetzen. Für Rot und Gelb ändert sich dann nichts. Im Blau jedoch beträgt nach Abschnitt III die vom Chlorophyll absorbierte Energie nur etwa 70% der gesamten absorbierten Energie, durch die Umrechnung wird also die im Blau zu klein gefundene Ausbeute größer, aber nunmehr im Sinne der Quantenbeziehung zu groß, so daß diese Art zu rechnen keine einfacheren Verhältnisse ergibt. Offenbar ist auch die von den gelben Farbstoffen absorbierte Energie photochemisch wirksam, aber mit schlechterer Ausbeute, als die von dem Chlorophyll absorbierte Energie. —

Es bleibt noch die Berechnung des Faktors k der Gleichung (1) k bedeutet die Zahl der Kohlensäuremoleküle, die von einem Quantum zerlegt werden, oder $\frac{1}{k}$ die Zahl der Quanten, die zur Zerlegung eines Kohlensäuremoleküls erforderlich sind.

Zur Berechnung von k dividieren wir beide Seiten der Gleichung (1) durch die Avogadrosche Zahl N_0 und erhalten

$$\frac{n}{N_0} = k \frac{Q}{h\nu N_0}$$

woraus

$$k = \varphi_0 \cdot h\nu \cdot N_0, \quad \varphi_0 \text{ in Molen/cal ausgedrückt} \qquad (2)$$

Setzen wir in Gleichung (2) die Mittelwerte von φ_0 in Molen/cal ein, so finden wir

Wellenlänge $\mu\mu$	$\varphi_0 \left[\frac{\text{Mole}}{\text{cal}}\right]$	$N_0 h\nu$ [cal]	k	$\frac{1}{k}$
660	$5{,}25 \cdot 10^{-6}$	43000	0,226	4,4
578	$4{,}75 \cdot 10^{-6}$	49200	0,234	4,3
436	$3{,}01 \cdot 10^{-6}$	65100	0,196	5,1

Setzen wir in Gleichung (2) die Höchstwerte von φ_0 in Molen/cal ein, so finden wir

Wellenlänge $\mu\mu$	$\varphi_0 \left[\frac{\text{Mole}}{\text{cal}}\right]$	$N_0 h\nu$ [cal]	k	$\frac{1}{k}$
660	$5{,}67 \cdot 10^{-5}$	43000	0,244	4,1
578	$5{,}42 \cdot 10^{-5}$	49200	0,267	3,8
436	$3{,}26 \cdot 10^{-5}$	65100	0,213	4,7

Man sieht aus der letzten Spalte der Tabellen, daß im Rot und Gelb etwa vier Quanten, im Blau etwa fünf Quanten zur Zerlegung eines Kohlensäuremoleküls erforderlich waren. Ob nun die Reduktion eines Kohlensäuremoleküls durch weniger als vier Quanten nicht möglich ist, oder ob man bei Verbesserung der Züchtungsmethoden auf noch höhere Ausbeuten, das heißt kleinere Werte von $\frac{1}{k}$ kommen wird, ist eine Frage, deren Beantwortung wir der Zukunft überlassen müssen.

Anmerkung. Lösungen von Chlorophyll fluoreszieren, wenn man sie mit Licht der grünen, der gelben oder der blauen Quecksilberlinie bestrahlt, eine Eigenschaft, die nach K. Stern[1] auch dem in der Zelle gebundenen Chlorophyll zukommt. Es wird also bei der Bestrahlung von Zellen mit gelb, grün oder blau immer ein Teil der absorbierten Energie in Fluorescenzlicht umgewandelt. Welchen Einfluß wird diese Umwandlung auf die Ausbeute haben?

Das Fluorescenzlicht in den drei genannten Farben ist rot und gibt bei spektraler Zerlegung zwei kontinuierliche Streifen von 630—650 $\mu\mu$ und von 660—690 $\mu\mu$. Diese Streifen liegen in der roten Absorptionsbande des Chlorophylls. Das Fluorescenzlicht ist also Licht, das von der Zelle stark absorbiert wird und das eine höhere Ausbeute gibt, als das erregende Licht. Deshalb wird eine Verwandlung von Gelb, Grün oder Blau in Fluorescenzlicht — über deren Umfang wir gar nichts aussagen können — die Ausbeute erhöhen, das heißt, dem Abfall der Ausbeute von Rot nach Blau hin entgegenwirken.

IX. Experimentelle Einzelheiten.

1. Die Farbfilter für die Quecksilberlampe.

Die Strahlung der Quecksilberlampe, die aus der Linse L_1 der Abb. 3 austritt, enthält an Spektralgebieten erheblicher Intensität:

Die ultraviolette Linie 366 $\mu\mu$.
Zwei blaue Linien 405 und **436** $\mu\mu$.
Die grüne Linie **546** $\mu\mu$.
Die gelbe Linie **578** $\mu\mu$.
Eine große Anzahl roter Linien zwischen 600 und 700 $\mu\mu$.
Ultrarot.

Aus diesem Gemisch waren die fett gedruckten Bezirke zu isolieren, die nach den Messungen E. Ladenburgs[2] mit annähernd gleicher Intensität von der Quecksilberlampe ausgestrahlt werden.

Zunächst kann man das kurzwellige Ende — die Linien 366 und 405 — durch Chinin, das langwellige Ende — Ultrarot und einen Teil des sichtbaren Rot — durch Wasser und Kupfersulfatlösung fortnehmen.

---

[1] Ber. d. d. bot. Ges. 38, 28. 1920.
[2] Physikal. Zeitschr. 5, 525. 1904.

Wir benutzen eine Lösung von 2 g Chinin in 100 ccm norm Salzsaure in 1 cm tiefer Schicht, die das Ultraviolett vollstandig und die Linie 405 zu 99,7% absorbiert, während sie die Linie 436 zu 99% durchläßt. Die Wasserschicht, die die Strahlung auf dem Weg bis zum Trog *T* der Abb. 3 durchsetzt, ist 20 cm und genügt zur Absorption des langwelligen Ultrarot Die Kupfersulfatlosung enthält 6 g Kupfersulfat ($CuSO_4$ 5 H_2O) in 100 ccm Wasser, ihre Tiefe ist 1 cm. Sie zeigt, mit dem Photometer von König-Martens gemessen, folgende Durchlässigkeiten:

Wellenlänge $\mu\mu$	Fur $d = 1$ cm $\frac{i}{i_0}$ 100
730	1
710	2,2
690	4,9
670	10,4
650	19,4
630	35,7
610	52,5
590	70,4

Die Kupferlosung laßt also das kurzwelligere Rot, wenn auch geschwacht, durch, und dieses Licht ist im wesentlichen die „Verunreinigung“ unserer Spektralbezirke Die Große der Verunreinigung messen wir fur jeden Bezirk, indem wir in den Strahlengang eine Farblosung einschalten, die zwar Rot vollstandig durchlaßt, den zu prufenden Bezirk jedoch vollstandig absorbiert Aus den Bolometerausschlagen ohne und mit „Pruflosung“ ergibt sich dann die Verunreinigung

Unsere Pruflosungen sind

Fur Blau 0,02 g Tartrazin 100 ccm Wasser in 1 cm tiefer Schicht Diese Losung absorbiert die Linie 436 vollstandig und laßt Rot vollstandig durch

Fur Grün 0,02 g Erythrosin 100 ccm Wasser in 1 cm tiefer Schicht Diese Losung absorbiert Grun vollstandig und laßt Rot vollstandig durch

Fur Gelb· 0,003 g Saurerhodamin 100 ccm Wasser in 1 cm tiefer Schicht. Diese Losung absorbiert Gelb vollstandig und laßt Rot vollstandig durch

Isolierung[1] *der blauen Linie λ 436*

1 Chinin 2%, 1 cm Tiefe.

2 Kupfersulfat 6%, 1 cm Tiefe.

[1] Die Auswahl der Farbstoffe geschah nach dem schönen Buch von A. Hübl, Die Lichtfilter, Halle 1921.

3. 0,003 g Saurerhodamin · 100 ccm Wasser in 1 cm Tiefe Dient zur Absorption von Gelb und Grun Durchlassigkeit nach König-Martens für λ 436 · 72 %, für λ 546: — %, für λ 578 · —%

4. $^1/_{10}$ mol Kupfersulfatlosung, mit norm Ammoniak bis zur vollständigen Lösung des Niederschlages versetzt, in 1 cm Tiefe Dient zur Schwächung des Rot und des vom Säurerhodamin ausgehenden Fluorescenzlichtes.

Die bolometrische Prufung der so filtrierten Strahlung ergibt·

Galvanometer-ausschlag	ohne Pruflosung	40 Skalenteile
	nach Einschaltung der Pruflosung	0,3 ,,

Die Verunreinigung mit Rot beträgt hiernach 0,7% Dazu kommt noch eine Verunreinigung mit Blau der Linie 405 von einigen $^1/_{10}$%.

Isolierung der grünen Linie λ 546.

1 Chinin, wie oben.

2. Kupfersulfat, wie oben

3. 0,02 g Tartrazin : 100 ccm Wasser in 1 cm Tiefe. Dient zur Absorption von Blau Durchlässigkeit nach König-Martens für λ 436: —%.

4 Didymglas von Schott und Gen., Jena. Dicke 1,3 cm Dient zur Absorption von Gelb Durchlassigkeit nach König-Martens fur λ 546 84%, für 578 1,3%

Die bolometrische Prufung der so filtrierten Strahlung ergibt

Galvanometer-ausschlag	ohne Pruflosung	64 Skalenteile
	nach Einschaltung der Pruflosung . .	2 ,,

Die Verunreinigung betragt hiernach 3,4% und ist im wesentlichen rot neben etwas gelb.

Isolierung der gelben Linie λ 578

1 Chinin, wie oben.

2 Kupfersulfat, wie oben

3 0,02 g Tartrazin, 0,02 g Erythrosin : 100 ccm Wasser in 1 cm Tiefe Dient zur Absorption von Blau und Grun. Durchlassigkeit nach König-Martens fur λ 436: —%, für λ 546: —%, fur λ 578 · 87%.

Die bolometrische Prüfung der so filtrierten Strahlung ergibt:

Galvanometer-ausschlag	ohne Prüflosung	63 Skalenteile
	nach Einschaltung der Pruflösung . .	2 ,,

Die Verunreinigung mit Rot beträgt hiernach 3,2%

2 Bolometerkorrektionen.

Die Formel des Abschnitts VI

$$e = 2{,}75 \cdot 22{,}6 \cdot 10^{-6}\,\frac{11400}{\omega}$$

gilt nur, wenn die Temperatur des Arbeitsraumes und die Akkumulatorenspannungen die gleichen sind, wie bei der Eichung des Bolometers. Ist jedoch

t die Temperatur des Arbeitsraumes bei der Eichung,
t' die Temperatur des Arbeitsraumes beim Versuch,
V_B die Spannung des Bruckenakkumulators bei der Eichung,
V'_B die Spannung des Bruckenakkumulators beim Versuch,
V_K die Spannung des Kompensationsakkumulators bei der Eichung,
V'_K die Spannung des Kompensationsakkumulators beim Versuch,

so wird

$$e = 2{,}75 \cdot 22{,}6\; 10^{-6}\,\frac{11400}{\omega\left(1 + 0{,}01\,\frac{t-t_1}{3}\right)} \cdot \frac{V'_K}{V_K} \cdot \frac{V_B}{V'_B}.$$

Mit Hilfe dieser Formel[1] sind alle beobachteten Kompensationswiderstande auf die Eichungsbedingungen reduziert worden ω in unseren Tabellen sind die so reduzierten Widerstande

3 Das Differentialmanometer

ist in unserer fruheren Arbeit[2] abgebildet In derselben Arbeit findet man auf S 264 unter (12) die Formel zur Berechnung der Gefaßkonstanten K

Das Volumen des Assimilationstroges bis zum Meniskus der auf gleichem Niveau stehenden Sperrflussigkeit war 53530 cmm, das Volumen der eingefullten Flussigkeit 37000 cmm, der Querschnitt der Manometercapillare 0,1575 qmm Als Sperrflussigkeit diente wiederum Capronsaure vom spez Gewicht $d_{16} = 0{,}926$ (Normaldruck in Capronsaure 11160 mm) Aus diesen Daten berechnet sich fur $T = 283^0$ $K = 2\,34$

Reinigt man die Manometercapillare mit heißer konzentrierter Salpetersaure und fullt reine, mehrfach destillierte Capronsaure ein, so ereignet es sich haufig, daß Capronsauretropfchen an den Wandungen der Capillare hangen bleiben, die dann beim Abfließen das enge Lumen der Capillare verschließen Dieses Verhalten hat uns große Schwierigkeiten bereitet. Wir haben schließlich gefunden, daß die storende Erscheinung nicht mehr auftritt, wenn man der Capronsaure eine sehr kleine Menge von gallensaurem Natron zusetzt, einem Stoff, den BRODIE aus demselben Grund als Zusatz zum Wasser von Wassermanometern empfohlen hat.

---

[1] Vgl E. WARBURG u. C. MULLER. Über einige Eigenschaften des Bolometers Verh. d. d. Physik. Ges 18, 245. 1916

[2] Zeitschr. f. physik. Chemie 102, 443. 1922

4. Beispiele von Protokollen *Vergleich von Gelb und Blau.*

Datum	λ	Zeit	Beobachtete Manometerausschläge (mm)				
14. 3	578 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 9,8 18,4 9,6	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	9,7 29,1 18,4	Differenz ΔH 10,7	ω 1060 Ohm E 0,245 cal W 25,1 cmm φ 102 cmm/cal
		600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 10,7 12,7 10,7	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	10,7 32,1 - 12,7	Differenz ΔH 19,4	ω 1045 Ohm E 0,458 cal W 45,4 cmm φ 99 cmm/cal
	436 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 8,9 - 18,75 -- 8,65	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	- 8,77 26,31 -- 18,75	Differenz ΔH = 7,56	ω 1720 Ohm E 0,279 cal W 17,8 cmm φ 63,8 cmm/cal
		600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt -- 10,0 - 15,35 9,95	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	-- 9,97 - 29,91 15,35	Differenz ΔH = 14,56	ω = 797 Ohm E = 0,602 cal W 34,1 cmm φ = 56,5 cmm/cal
5. 4	436 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt -- 8,75 --- 17,90 - 8,60	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	- 8,67 - 26,01 17,90	Differenz ΔH = 8,11	ω 1590 Ohm E = 0,302 cal W = 19,0 cmm φ 63 cmm/cal
		600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt -- 7,95 - 19,65 — 7,75	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	- 7,85 -- 23,55 - 19,65	Differenz ΔH = 3,9	ω = 3430 Ohm E = 0,140 cal W = 9,15 cmm φ = 65,3 cmm/cal
	578 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt - 9,7 -- 8,85 - 10,05	300″ dunkel 900″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel	- 9,87 — 29,61 - 8,85	Differenz ΔH = 20,76	ω = 1080 Ohm E = 0,444 cal W = 48,8 ccm φ = 110 cmm/cal

Vergleich von Rot und Gelb

Datum	λ	Zeit	Beobachtete Manometerausschläge (mm)	
18. 4.	610 bis 690 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt — 10,60 } 300″ dunkel — 10,45 — 22,0 } 900″ dunkel — 31,35 } Differenz — 10,3 } 600″ hell 300″ dunkel — 22,00 } $\varDelta H$ = 9,35	ω = 2470 Ohm E = 0,194 cal W = 21,9 cmm φ = 113 cmm/cal
	578 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt — 10,15 } 300″ dunkel — 10,3 — 13,25 } 900″ dunkel — 30,9 } Differenz — 10,45 } 600″ hell 300″ dunkel — 13,25 } $\varDelta H$ = 17,65	ω = 1180 Ohm E = 0,407 cal W = 41,5 cmm φ = 102 cmm/cal
	610 bis 690 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt — 10,05 } 300″ dunkel — 9,92 12,15 } 900″ dunkel — 29,76 } Differenz — 9,8 } 600″ hell 300″ dunkel — 12,15 } $\varDelta H$ = 17,61	ω = 1260 Ohm E = 0,381 cal W = 41,2 cmm φ = 108 cmm/cal
19 4	578 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 10,75 } 300″ dunkel — 10,75 22,20 } 900″ dunkel — 32,25 } Differenz 10,75 } 600″ hell 300″ dunkel — 22,20 } $\varDelta H$ = 10,05	ω = 2110 Ohm E = 0,228 cal W = 23,5 cmm φ = 103 cmm/cal
	610 bis 690 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 10,4 } 300″ dunkel 10,40 21,8 } 900″ dunkel 31,20 } Differenz 10,4 } 600″ hell 300″ dunkel 21,80 } $\varDelta H$ 9,4	ω = 2410 Ohm E = 0,199 cal W = 22,0 cmm φ 111 cmm/cal
	578 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 11,3 } 300″ dunkel 11,25 15,05 } 900″ dunkel 33,75 } Differenz 11,2 } 600″ hell 300″ dunkel — 15,05 } $\varDelta H$ = 18,7	ω 1160 Ohm E 0,414 cal W = 43,8 cmm φ = 106 cmm/cal
	610 bis 690 $\mu\mu$	600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel 600″ hell 300″ dunkel 300″ dunkel	vorbehandelt 10,90 } 300″ dunkel — 10,92 14,50 } 900″ dunkel 32,76 } Differenz 10,95 } 600″ hell 300″ dunkel 14,50 } $\varDelta H$ 18,26	ω 1260 Ohm E 0,382 cal W 43,0 cmm φ = 113 cmm/cal

Biochem Zeitschr. 146, 486. 1924

Über die Blackmansche Reaktion.

Von

Otto Warburg und Tsunao Uyesugi.

(Eingegangen am 18 Februar 1924)

Als BLACKMANsche Reaktion bezeichnen wir den chemischen Vorgang, der bei sehr starker Bestrahlung einer grunen Zelle das Tempo der Kohlensaurespaltung bestimmt Die BLACKMANsche Reaktion zeichnet sich aus durch ihre Temperaturempfindlichkeit[1] und ihre Blausaureempfindlichkeit[2] Erhohung der Temperatur beschleunigt sie, Blausäure in kleinen Konzentrationen hemmt sie. Die ubrigen Teilvorgänge der Assimilation sind weder temperatur- noch blausaureempfindlich. Betrahlen wir eine grüne Zelle sehr schwach, so bewirkt Erhohung der Temperatur keine Beschleunigung[1], Blausaure keine Hemmung[2] der Kohlesaurespaltung.

Fragt man nach der Bedeutung der BLACKMANschen Reaktion, so liegen, wie es scheint, zwei Moglichkeiten vor sie kann eine „vorbereitende" Reaktion sein, die der Wirkung des Lichtes vorangeht, oder eine „fortfuhrende" Reaktion, die auf die Wirkung des Lichtes folgt Beide Auffassungen sind geaußert worden, die erste von WARBURG[2], die zweite von WILLSTATTER[3], beide lassen sie sich in Einklang bringen mit der Kinetik des Assimilationsvorganges, die also nicht imstande ist, eine Entscheidung zwischen beiden Theorien zu treffen

WARBURG nahm an, in der BLACKMANschen Reaktion bilde sich der „photochemische Acceptor", ein photochemisch angreifbares Derivat der Kohlensaure WILLSTATTER sprach die Vermutung aus, bei der photochemischen Reduktion der Kohlensaure entstehe ein Peroxyd, und die Abspaltung von Sauerstoff aus diesem Peroxyd sei die BLACKMANsche Reaktion. Da sich die Theorie von WARBURG nicht bewahrt hat, so soll sie aufgegeben werden. Ist WILLSTATTERS Theorie richtig,

---

[1] BLACKMAN: Ann. of Bot. 19, 281, 1905.

[2] WARBURG, O.: diese Zeitschr. 100, 230 1919; 103, 188 1920.

[3] WILLSTATTER u. STOLL · Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

so ist anzunehmen, daß Peroxyde, in eine lebende grüne Zelle eingeführt, gespalten werden und daß diese Spaltung sich ähnlich verhält wie die BLACKMANsche Reaktion. Von diesem Gesichtspunkte aus haben wir die Spaltung von Wasserstoffperoxyd durch Chlorella näher untersucht und diese Peroxydspaltung mit der BLACKMANschen Reaktion verglichen.

Die Anordnung der Versuche war folgende: Wir suspendierten Chlorellen in KNOPscher Lösung, brachten die Suspensionen in Atmungströge, die in einem Thermostaten bewegt wurden, und ließen, wenn Temperaturgleichgewicht eingetreten war, aus einer kleinen Birne so viel Wasserstoffperoxyd zufließen, daß die Konzentration an Peroxyd in der KNOPschen Lösung m/300 war. KNOPsche Lösung, die sauer ist, zersetzt unter den Bedingungen unserer Versuche Wasserstoffperoxyd nicht merklich. Sind jedoch Chlorellen in der Lösung, so wird Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff gespalten, und die Geschwindigkeit dieser Spaltung kann an einem angeschlossenen Barcroftmanometer genau verfolgt werden. Wählt man dabei die Zellmengen so klein, daß in den ersten 15—30 Minuten nach Zugabe des Wasserstoffperoxyds die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung nur wenig abfällt, so kann man ohne umständliche Rechnung die Geschwindigkeit des Zerfalls aus den beobachteten Druckänderungen berechnen und — wenn die verwendeten Zellmengen gleich sind — die Geschwindigkeiten des Zerfalls unter der Einwirkung verschiedener Stoffe vergleichen. Erscheint beispielsweise in reiner KNOPscher Lösung nach t Minuten der Druck p_0 und unter sonst gleichen Bedingungen nach Zusatz eines Stoffes der kleinere Druck p_1, so ist die Hemmung der Zerfallsgeschwindigkeit, die der zugesetzte Stoff hervorbringt, gleich $\frac{p_0 - p_1}{p_0}$.

Mit Hilfe dieser Anordnung haben wir zunächst die Wirkung der Blausäure auf den Zerfall des Wasserstoffperoxyds untersucht. Spalte 2 der Tabelle 1 enthält das Ergebnis der Messungen. Blausäure hemmt den Zerfall des Peroxyds, und zwar beginnt die Hemmung bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{200\,000}$ Mol pro Liter und ist bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{1000}$ Mol pro Liter fast vollständig. Nachdem dies festgestellt war, haben wir die früheren Versuche[1] über die Wirkung der Blausäure auf die BLACKMANsche Reaktion wiederholt, um die Wirkung der Blausäure auf beide Vorgänge für dieselbe Chlorellakultur vergleichen zu können. Wir hielten uns dabei genau an die früher beschriebene Versuchsanordnung und bestimmten die Wirkung der

[1] WARBURG, O., diese Zeitschr. 100, 230. 1919; 103, 188. 1920.

Blausäure auf die Sauerstoffentwicklung einer sehr stark bestrahlten kohlensäurehaltigen Algensuspension in Lösungen, die natürlich frei von Wasserstoffperoxyd waren.

Tabelle 1.

Konzentration der Blausäure	1 Hemmung der BLACKMANschen Reaktion %	2 Hemmung des Wasserstoffperoxydzerfalls %
n/200000 . . .	20	32
n/10000 . . .	55	83
n/1000	95	93

Spalte 1 der Tabelle 1 enthält das Ergebnis der Messungen. Die BLACKMANsche Reaktion wird durch Blausäure gehemmt, und zwar beginnt die Hemmung bei einigen $^1/_{100\,000}$ Molen Blausäure pro Liter und ist bei einer Blausäurekonzentration von $^1/_{1000}$ Mol pro Liter fast vollständig. Die Übereinstimmung in dem Verhalten der beiden Vorgänge, der Peroxydspaltung im Dunkeln und der Sauerstoffentwicklung aus Kohlensäure bei Bestrahlung gegenüber Blausäure ist also eine weitgehende, wenn auch die Form der Hemmungskurven in beiden Fällen verschieden zu sein scheint.

Des weiteren haben wir die Wirkung einiger Narkotica auf den Zerfall des Wasserstoffperoxyds untersucht, und zwar die Wirkung der Urethane. Spalte 3 der Tabelle 2 enthält das Ergebnis der Messungen,

Tabelle 2.

Narkotikum	1 Atmungshemmung um 50% durch Millimol Lit.	2 Hemmung der BLACKMANschen Reaktion um 50% durch Millimol Liter	3 Hemmung des H_2O_2-Zerfalls um 50% durch Millimol Liter
Methylurethan	1200	660	440
Äthylurethan	780	225	135
Propylurethan	100	73	80
Butylurethan (iso)	43	26	27
Amylurethan (iso)	32	12	weniger als 9
Phenylurethan .	6	0,5	weniger als 1.5

aus denen man erkennt, daß der Peroxydzerfall durch Narkotica gehemmt wird, und daß er ein Vorgang ist, der sich an Oberflächen abspielt. Nachdem dies festgestellt war, haben wir die Versuche A. v. RANKES[1] über die Beeinflussung der BLACKMANschen Reaktion durch Narkotica

[1] WARBURG, O.: diese Zeitschr. 100, 230. 1919, 103, 188. 1920.

wiederholt, um so die Wirkung der Narkotica auf beide Vorgange für dieselbe Chlorellakultur vergleichen zu können Wir hielten uns dabei genau an die früher beschriebene Versuchsanordnung und fanden mit geringen Abweichungen dieselben Werte wie A. v RANKE (vgl Spalte 2 der Tabelle 2). In Spalte 1 der Tabelle 2 fuhren wir noch die Werte für die Atmungshemmung der Chlorella an, die wir nicht neu bestimmt, sondern einer früheren Arbeit[1] entnommen haben Bei Betrachtung der Tabelle 2 erkennt man die weitgehende Übereinstimmung in dem Verhalten der Peroxydspaltung und der BLACKMANschen Reaktion gegenüber den geprüften Narkotica Der Peroxydzerfall ist erheblich empfindlicher als die Atmung, aber mindestens ebenso empfindlich wie die BLACKMANsche Reaktion.

Beide Tabellen sprechen durchaus zugunsten von WILLSTATTERS Theorie. Allerdings ist die Übereinstimmung in dem Verhalten der Peroxydspaltung und der BLACKMANschen Reaktion keine vollkommene, aber eine solche ist auch dann nicht zu erwarten, wenn der Katalysator beider Vorgänge identisch ist Denn WILLSTATTERS Peroxyd ist nicht Wasserstoffperoxyd, das Substrat in beiden Fallen also jedenfalls verschieden

Experimenteller Teil.

Die Chlorellen wurden nach einer fruher gegebenen Vorschrift[2] in KNOPscher Losung gezuchtet Die Zellmengen, die fur eine Messung verwendet wurden, waren: fur die Messung der Peroxydspaltung je 0,05 ccm Zellen = 10 mg Trockensubstanz pro Trog, fur die Messung der BLACKMANschen Reaktion je 0,02 ccm Zellen = 4 mg Trockensubstanz pro Trog Diese Angaben sollen nur einen ungefahren Anhaltspunkt fur die einzuhaltenden Mengenverhaltnisse geben Die Zellmengen in verschiedenen Versuchen genau gleich zu halten ware muhsam und zwecklos, da die Wirksamkeit pro Milligramm Zellsubstanz je nach dem Zustande der Kultur schwankt Um die Wirkung eines Stoffes zu ermitteln, mussen von ein und derselben Zellsuspension genau gleiche Volumina abpipettiert werden und die in ihnen enthaltenen Zellmengen — ohne Zusatz und mit Zusatz — gleichzeitig gepruft werden

Wie schon fruher, so stellte sich auch in dieser Arbeit heraus, daß die Atmung der Chlorella schnell im Dunkeln abfallt, offenbar weil die Alge, im Gegensatz zu tierischen Zellen, arm an verbrennlicher Substanz ist. Die Tatsache, daß zugesetzte organische Stoffe, falls ihre Konzentrationen nicht zu hoch sind, die Atmung beschleunigen,

[1] WARBURG, O. diese Zeitschr. 102, 188 1920.
[2] Zeitschr. f. physik. Chem. 10 , 250 1922.

erklären wir so, daß sie der Chlorella als Brennmaterial dienen Blausaure wirkt, wie sich wiederum[1] zeigte, selbst in hohen Konzentrationen auf die Atmung der Chlorella nicht hemmend, sondern, wie alle ubrigen organischen Stoffe, beschleunigend

Messung der Wasserstoffperoxydspaltung. Je 10 ccm Zellsuspension wurden in Atmungstroge der in dieser Zeitschr 142, 494, 1923, abgebildeten Form eingefullt, in den Einsatz zur Absorption der Atmungskohlensaure 1 ccm 5proz Kalilauge Die Suspensionsflüssigkeit war KNOPsche Losung, im Gasraume befand sich Luft. Die Temperatur des Thermostaten war 20°, das Zimmer wahrend der Messungen verdunkelt Das Gesamtvolumen der Gefaße war 30 ccm, die Gefaßkonstante fur Sauerstoff, da etwa 11 ccm Flussigkeit eingefüllt waren, etwa 2, was bedeutet, daß eine Druckanderung von 1 mm den Verbrauch oder die Entwicklung von 2 cmm Sauerstoff anzeigte

Das Wasserstoffperoxyd war aus Natriumperoxyd und primarem Natriumphosphat nach W FRIEDRICH (vgl VANINO, Praparat. Chemie 1, 10. 1921) hergestellt und im Vakuum destilliert Je 0,5 ccm einer m 15 Lösung wurden in die Ansatzbirne eingefüllt, ihr Inhalt, nachdem Temperaturausgleich eingetreten war, dem Inhalt des Atmungstroges zugefugt, in dem die Konzentration an Wasserstoffperoxyd dann m 300 war

Die auftretenden Druckanderungen wurden etwa 30 Minuten lang beobachtet Fur die Berechnung dienten nur die in den ersten 15 Minuten auftretenden Druckanderungen

Eine Schwierigkeit bei den Peroxydversuchen war die Frage, in welcher Weise die Atmung bei der Berechnung zu berucksichtigen sei Erhalt man in dem peroxydfreien Troge infolge der Atmung einen negativen Druck von 20 mm und gleichzeitig in dem peroxydhaltigen Troge einen positiven Druck von 100 mm, so weiß man zunachst nicht, ob die Peroxydspaltung 100 oder 120 mm entspricht Doch ist anzunehmen, daß eine Zelle, der Wasserstoffperoxyd zur Verfugung steht, dieses an Stelle des molekularen Sauerstoffs in der Atmung verbraucht, daß also in einer peroxydhaltigen Lösung molekularer Sauerstoff von der Zelle nicht absorbiert wird Unter dieser Voraussetzung haben wir die Peroxydspaltung berechnet und nur die positiven Drucke berucksichtigt[2] Erkennt man diese Voraussetzung nicht an, so kann man die Tabellen unter Berücksichtigung der Atmung, die immer angegeben

[1] Diese Zeitschr. **100**, 230. 1919.

[2] Ist h der beobachtete positive Druck, K_{O_2} die Gefäßkonstante fur Sauerstoff, so ist die entwickelte Sauerstoffmenge x_{O_2} in cmm

$$x_{O_2} = hK_{O_2}.$$

ist, umrechnen An dem Wesentlichen unserer Ergebnisse andert sich dadurch nichts

Messung der Blackmanschen Reaktion: Die Form der Gefaße war die in dieser Zeitschr. **100**, 246, Abb 3 abgebildete Die Suspensionsflussigkeit war KNOPsche Losung, der Gasraum erhielt Luft mit 4 Vol -Proz Kohlensaure. Als Lichtquelle verwendeten wir $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampen, und zwar 75-Wattlampen, deren leuchtender Faden sich in einigen Zentimetern Entfernung von dem Assimilationstroge befand Die Beleuchtungsstarke war dann so hoch, daß ihre Vermehrung ohne Einfluß auf die Kohlensaurespaltung war. Die Lampen wurden nach dieser Zeitschr. **100**, 245, Abb 2 montiert Die Temperatur des Thermostaten war 20°.

War K_{O_2} die Gefaßkonstante fur Sauerstoff, K_{CO_2} die Gefäßkonstante fur Kohlensaure, so war die zersetzte Kohlensäuremenge x_{CO_2} in Kubikmillimetern

$$x_{CO_2} = h \frac{K_{O_2} K_{CO_2}}{K_{CO_2} - K_{O_2}},$$

wo h die beobachtete Druckanderung in Millimetern BRODIEscher Flussigkeit bedeutet.

Protokolle.

Tabelle 3 *Blausäure auf Atmung und H_2O_2-Zerfall*

HCN Mol Liter	Atmung		H_2O_2-Zerfall	
	ohne HCN cmm O_2	mit HCN cmm O_2	ohne HCN cmm O_2	mit HCN cmm O_2
1/200000	15′ — 26 30 34	15′ — 24 30 — 31	15 — 74 30 — 157	15 - 50 30 — 106
1/10000	15′ — 34 30 — 44	15′ — 35 30 — 50	15 — 62 30 — 119	15 11 30 - 32
1/1000	15′ — 8 30 — 16	15′ — 18 30 — 35	15′ — 84 30 · — 146	15 - 6 30 - 17

Tabelle 4 *Blausäure auf Blackmansche Reaktion*

HCN Mol Liter	Atmung (dunkel)		Assimilation (hell)	
	ohne HCN cmm O_2	mit HCN cmm O_2	ohne HCN cmm O_2	mit HCN cmm O_2
1/200000	15′: — 4 30 · — 6	15′ — 5 30 — 7	15′: — 43 30 : — 83	15′ — 34 30 — 64
1/10000	15′: — 4 30 : — 6	15′ — 5 30 — 9	15′: 48 30 : + 91	15′ — 18 30 — 34
1/1000	15′: — 4 30 . — 6	15′: — 7 30 · — 9	15′: — 48 30 : — 97	15′ — 5 30 . — 5

Tabelle 5

Urethane auf Atmung und H_2O_2-Zerfall

Substanz	Gew.-Proz	Atmung ohne Urethan cmm O_2	Atmung mit Urethan cmm O_2	H_2O_2-Zerfall ohne Urethan cmm O_2	H_2O_2-Zerfall mit Urethan cmm O_2
Methylurethan	2	15′ — 9 30 — 15	15′ — 12 30 — 22	15′ + 78 30 — 146	15′ + 54 30 + 99
	4	15′ — 12 30 — 19	15′ — 14 30 — 26	15′ — 51 30 — 93	15′ + 19 30 + 39
Äthylurethan	1	15′ — 16 30 — 26	15′ — 25 30 — 41	15′ — 75 30 + 136	15′ + 41 30 + 78
	2	15 — 15 30 — 22	15′ — 22 30 — 35	15′ + 73 30 + 142	15′ + 22 30 + 41
Propylurethan	0.5	15′ — 14 30 — 22	15′ — 21 30 — 35	15′ + 87 30 + 152	15′ — 62 30 — 113
	1	15′ — 9 30 — 12	15′ — 14 30 — 21	15′ + 57 30 + 114	15′ — 23 30 — 48
Butylurethan	0.2	15′ — 12 30 — 20	15′ — 27 30 — 45	15′ + 97 30 + 166	15′ + 58 30 + 102
	0.4	15′ — 16 30 — 29	15′ — 14 30 — 27	15′ + 75 30 + 137	15′ + 32 30 — 61
Amylurethan	16	15′ — 26 30 — 23	15′ — 47 30 — 69	15′ + 73 30 — 138	15′ — 23 30 + 50
Phenylurethan	0.025	15′ — 22 30 — 29	15′ — 43 30 — 66	15′ + 73 30 + 138	15′ + 32 30 — 60

Tabelle 6.

Urethane auf Blackmansche Reaktion.

Substanz	Gew.-Proz.	Atmung (dunkel) ohne Urethan cmm O_2	Atmung (dunkel) mit Urethan cmm O_2	Assimilation (hell) ohne Urethan cmm O_2	Assimilation (hell) mit Urethan cmm O_2
Methylurethan	3	15′ — 3 30 — 8	15′ — 5 30 — 12	15′ — 45 30 — 84	15′ — 31 30 — 56
	5	15′ — 5 30 — 13	15′ — 5 30 — 10	15′ — 56 30 + 107	15′ + 20 30 + 36
Äthylurethan	2	15′ — 5 30 — 10	15′ — 5 30 — 12	15′ + 62 30 + 124	15′ + 28 30 — 53
Propylurethan	0.75	15′ — 5 30 — 13	15′ — 8 30 — 16	15′ — 94 30 + 174	15′ + 39 30 + 66
Butylurethan	0,3	30 — 8	30 — 14	15′ — 134 30 — 265	15′ — 76 30 + 154
Amylurethan	0.16	15′ — 4 30 — 8	15′ — 8 30 — 13	15′ + 76 30 + 164	15′ + 32 30 + 64
henylurethan	0,0088	30 — 4	15′ — 5 30 — 12	15′ — 155 30 + 315	15′ + 62 30 + 118

Biochem. Zeitschr. 152, 498. 1924

Über den Temperaturkoeffizienten der Kohlensäureassimilation.

(II. Mitteilung uber die Blackmansche Reaktion[1]).

Von

Muneo Yabusoe.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem)

(Eingegangen am 2. Oktober 1924.)

Mit 3 Abbildungen

Wie BLACKMAN[2] fand wird die photochemische Kohlensaurespaltung in grunen Zellen durch die Temperatur nicht beeinflußt Schwach bestrahlte grune Zellen zersetzen pro Calorie absorbierter Strahlung bei verschiedenen Temperaturen gleiche Kohlensauremengen

Andererseits zeigte BLACKMAN[2], daß die Kohlensaureassimilation beim Übergang von schwacher zu intensiver Bestrahlung temperaturempfindlich wird Dieses merkwurdige Verhalten ruhrt daher[2,3] daß je nach der Intensitat der Bestrahlung verschiedene Vorgange die Geschwindigkeit der Kohlensaurezersetzung bestimmen Bei intensiver Bestrahlung ist der limitierende Vorgang nicht die Lichtreaktion sondern eine Dunkelreaktion die BLACKMANsche Reaktion und diese letztere ist temperaturempfindlich Spricht man von dem Temperaturkoeffizienten der Kohlensaureassimilation so meint man also immer den Temperaturkoeffizienten der BLACKMANschen Reaktion

I.

Ich habe auf Veranlassung von Herrn WARBURG den Einfluß der Temperatur auf die BLACKMANsche Reaktion naher untersucht Als Versuchsmaterial benutzte ich Chlorellen die in KNOPscher Losung

[1] Erste Mitteilung O WARBURG u T. UJESUGI, diese Zeitschrift 146, 486 1924.

[2] BLACKMAN: Ann of Botany 19, 281 1905

[3] WARBURG, O.: diese Zeitschr 100, 230. 1919; 103, 188. 1920

suspendiert waren. Die Suspensionen wurden mit einem Gasgemisch von 5 Vol.-Proz. Kohlensaure, 2 Vol.-Proz. Sauerstoff und 93 Vol.-Proz. Stickstoff gesättigt und in dunnen Schichten so stark bestrahlt, daß eine Vermehrung der Lichtintensitat keine Beschleunigung der Assimilation bewirkte. Die bei der Bestrahlung im Assimilationstrog auftretenden Druckänderungen wurden gemessen und aus ihnen in bekannter[1] Weise die zersetzten Kohlensauremengen berechnet

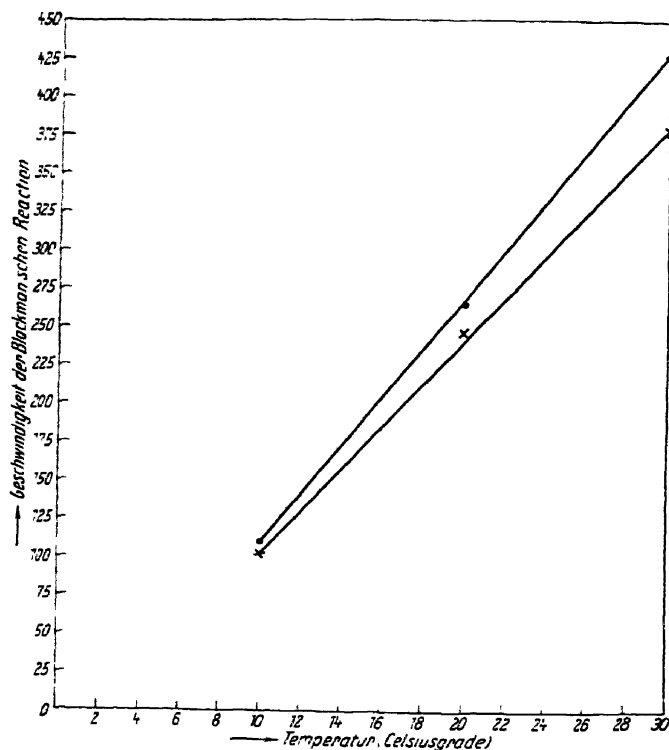



Abb 1

Die pro Versuch verwendeten Zellmengen waren 100 cmm frischer Zellsubstanz = 20 mg Trockensubstanz Das Volumen der KNOPschen Losung war 8 ccm, das Volumen des Gasraumes 10 ccm. 1 mm Druckanderung zeigte, je nach der Temperatur, die Zersetzung von 2—3 cmm Kohlensäure an In bezug auf die Formeln, nach denen ich gerechnet

[1] In der Arbeit von O. WARBURG, diese Zeitschr **100**, 230, 1919, findet man einige Messungen des Temperaturkoeffizienten der BLACKMANschen Reaktion Stellt man die Messungen graphisch dar, so erhält man auch dort eine gerade Linie

habe, und sonstige Einzelheiten verweise ich auf frühere Arbeiten aus diesem Institut.

Das Ergebnis meiner Messungen ist, daß die Geschwindigkeit der BLACKMANschen Reaktion zwischen 10 und 30° eine lineare Funktion der Temperatur ist[1]. Bei tieferen Temperaturen treten Abweichungen von dieser einfachen Beziehung auf, und zwar ist die Geschwindigkeit bei tiefen Temperaturen größer, als sie bei linearem Verlauf der Kurve wäre (vgl. Tabelle 1 und Abb. 1)

Tabelle 1. *Blackmansche Reaktion.*

Temperatur °C	Versuch 1 2 mg Zellsubstanz Pro Stunde entwickelter Sauerstoff cmm	Versuch 2 2 mg Zellsubstanz. Pro Stunde entwickelter Sauerstoff cmm
5	50	—
10	101	110
20	248	266
30	380	430

Der Einfluß der Temperatur auf die Kohlensäureassimilation ist also ein durchaus anderer als der Einfluß der Temperatur auf chemische Reaktionen im homogenen System Bezeichnen wir die Geschwindigkeitskonstante mit k, die Temperatur mit ϑ, so findet man in homogenen Systemen, daß $\frac{dk}{d\vartheta}$ sehr stark mit der Temperatur wächst und daß oft, worauf VAN 'T HOFF aufmerksam gemacht hat, $\frac{dk}{d\vartheta}$ proportional k ist

In homogenen Systemen ist also vielfach $\frac{\frac{dk}{d\vartheta}}{k}$ konstant, in unserem Falle dagegen ist $\frac{dk}{d\vartheta}$ konstant

Bekanntlich versteht VAN'T HOFF[2] unter dem „Geschwindigkeitsquotienten" nicht den Differentialquotienten der Geschwindigkeit nach der Temperatur, sondern das Verhältnis der Geschwindigkeiten für ein gegebenes Temperaturintervall Ist nun $\frac{\frac{dk}{d\vartheta}}{k}$ konstant, so ist es auch der Geschwindigkeitsquotient, ist aber $\frac{dk}{d\vartheta}$ konstant, so nimmt

---

[1] In der Arbeit von O. WARBURG, diese Zeitschr. **100**, 230 1919, findet man einige Messungen des Temperaturkoeffizienten der BLACKMANschen Reaktion. Stellt man die Messungen graphisch dar, so erhält man auch dort eine gerade Linie.

[2] Der VAN 'T HOFFsche Geschwindigkeitsquotient für 10° ist das, was in der Biologie unzulässigerweise als Temperaturkoeffizient bezeichnet wird.

der Geschwindigkeitsquotient mit steigender Temperatur ab und besitzt jeden Wert zwischen ∞ und 1

Schon vor vielen Jahren haben O WARBURG[1] und A. KROGH[2] darauf hingewiesen, daß die VAN 'T HOFFsche und die ihr ähnliche ARRHENIUSsche Beziehung, die für homogene chemische Systeme gilt, auf chemische Vorgänge in Zellen nicht allgemein anwendbar ist Insbesondere hat schon A. KROGH einige Fälle beschrieben, in denen die Geschwindigkeit des chemischen Umsatzes eine lineare Funktion der Temperatur ist.

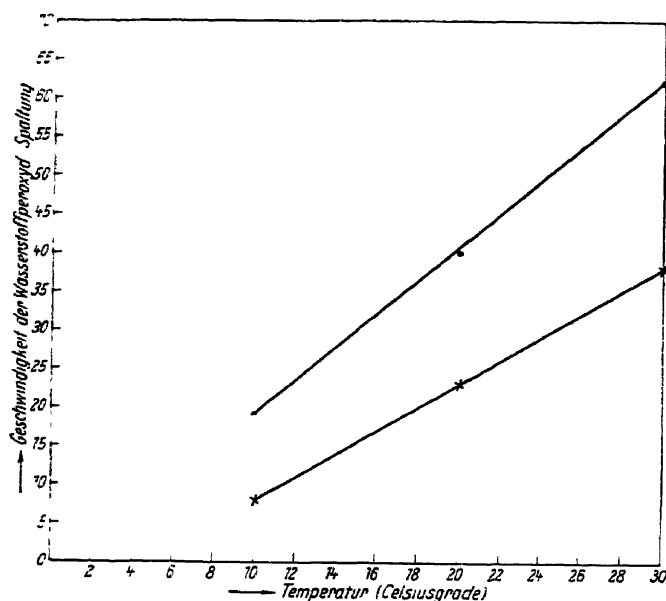



Abb 2

II.

WARBURG und UJESUGI[3] haben gezeigt, daß die BLACKMANsche Reaktion sich gegenüber chemischen Einflüssen ähnlich verhält wie Spaltung die von Wasserstoffperoxyd in der Zelle Bringt man Chlorellen in verdünnte Lösungen von Wasserstoffperoxyd, so zersetzen sie — im Dunkeln — das Peroxyd zu Wasser und Sauerstoff, ein Vorgang der durch Blausäurekonzentrationen von n/200000 merklich gehemmt wird. Bei der gleichen Blausäurekonzentration — in Lösungen, die frei von Wasserstoffperoxyd sind — tritt eine Hemmung der BLACKMAN-

[1] WARBURG, O.: Ergebn d Physiol. 14, 253. 1914.
[2] KROGH, A.: Zeitschr. f allgem Physiol. 16, 163 und 178. 1914.
[3] WARBURG, O. u. T. UJESUGI: diese Zeitschr. 146, 486. 1924.

schen Reaktion auf Dieser und ähnliche Versuche sprechen zugunsten der Annahme, daß die BLACKMANsche Reaktion — was schon WILLSTÄTTER[1] vermutete — nichts anderes ist als die Spaltung eines bei der Kohlensäurereduktion gebildeten Peroxyds

Um den Gedanken weiter zu verfolgen, habe ich den Einfluß der Temperatur auf die Peroxydspaltung geprüft Die Chlorellen befanden sich — bei Abschluß von Licht — in luftgesättigter KNOPscher Lösung, das Wasserstoffperoxyd in einer Ansatzbirne des Meßtroges. Sofort nach dem Einkippen des Peroxyds begann die Druckmessung, die nach 15 Minuten immer beendet war. Die Konzentration des Wasserstoffperoxyds in der KNOPschen Lösung war hierbei nach dem Einkippen m/300 und konnte während der Messung als konstant betrachtet werden.

Die Messungen lehrten, daß auch die Geschwindigkeit der Peroxydspaltung zwischen 10 und 30° eine lineare Funktion der Temperatur ist, und weiterhin, daß auch hier beim Übergang zu tieferen Temperaturen

Tabelle 2. *Peroxydspaltung.*

Temperatur °C	Versuch 1 4 mg Zellsubstanz In 15 Min. entwickelter Sauerstoff cmm	Versuch 2 3,6 mg Zellsubstanz. In 15 Min entwickelter Sauerstoff cmm
5	4,5	—
10	7,8	19
20	23	40
30	38	62

Abweichungen von dem linearen Verlauf auftreten (Tabelle 2 und Abb. 2) In dieser Übereinstimmung erblicke ich ein neues Argument zugunsten der Annahme daß die BLACKMANsche Reaktion eine Peroxydspaltung ist

III.

Die Form der Temperaturfunktion die ich für die BLACKMANsche Reaktion und die Peroxydspaltung gefunden habe, ist zwar wie erwähnt, in einigen Fällen schon von A KROGH beobachtet worden, ist aber doch selten Natürlich bedeutet die Ähnlichkeit der Temperaturfunktion in den beiden von mir beschriebenen Fällen um so mehr, je seltener diese Form der Funktion ist

Ich habe außer der BLACKMANschen Reaktion und der Peroxydspaltung noch einige andere Vorgänge untersucht, die Atmung der roten Vogelblutzellen, die Atmung der Hefezellen die Gärung der

[1] WILLSTÄTTER u. STOLL. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

Hefezellen, die Gärung der Milchsäurebakterien, die Glykolyse der Carcinomzelle, die Leucinoxydation an Kohle, und habe in allen diesen Fällen keine lineare Temperaturfunktion gefunden, sondern ein Ansteigen des $\frac{dk}{d\vartheta}$ mit der Temperatur

Besonders bemerkenswert erscheint es mir daß die Atmung der Chlorella durch die Temperatur in ganz anderer Weise beeinflußt wird als die Peroxydspaltung und die BLACKMANsche Reaktion. Ein Bei-

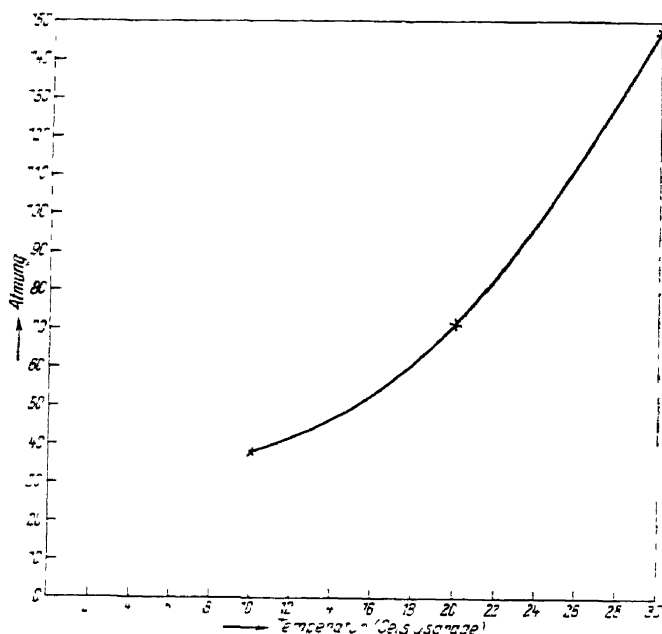



Abb. 3

spiel sei mitgeteilt (Tabelle 3 und Abb 3), das zeigt, daß die Temperaturfunktion der Atmung keine gerade Linie ist, sondern daß wir hier das übliche Steigen des $\frac{dk}{d\vartheta}$ mit der Temperatur finden.

Tabelle 3 *Atmung.*

Temperatur ^{0} C	20 mg Zellsubstanz Pro Stunde verbrauchter Sauerstoff cmm
10	38
20	71
30	147

Bemerkung über die Anwendung der Quantentheorie auf die Kohlensäureassimilation.

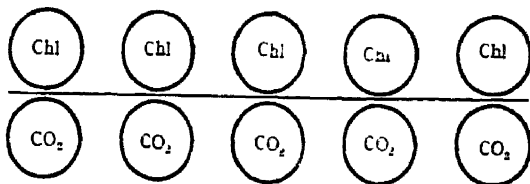
Von

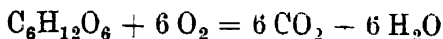
Otto Warburg.

V. Henri hat in den Naturwissenschaften Jahrgang 14 Heft 9. 1926 die Ansicht vertreten, daß man auf die Kohlensäureassimilation, weil sie zu kompliziert sei, die Quantentheorie nicht anwenden könne. Ich habe darauf folgendes erwidert (Naturwissenschaften Jahrgang 14, Heft 9. 1926):

Ich gehe von der Tatsache aus, daß die Kohlensäureassimilation ein Vorgang ist, der sich an festen Grenzflächen abspielt. Man denke sich das Chlorophyll an dem festen Gerüst des Chlorophyllkorns (Stroma) in einfach-molekularer Schicht ausgebreitet und an diesem gefärbten Gerüst die Kohlensäure (oder ein Derivat der Kohlensäure von gleicher Oxydationsstufe) adsorbiert (vgl. Skizze).

Chl Chl Chl Chl Chl

CO_2 CO_2 CO_2 CO_2 CO_2

Belichten wir, so wird das Chlorophyll chemisch aktiviert und reduziert die Kohlensäure, wobei es selbst in den Normalzustand zurückkehrt. Da *ein* Absorptionsvorgang nicht reicht, um die Kohlensäure zur Stufe der Glucose zu reduzieren, muß sich ein solcher Vorgang mehrmals wiederholen. Ist dies geschehen und die Reduktionsstufe der Glucose erreicht, so löst sich das Endprodukt von der Oberfläche ab und wird durch ein neues Kohlensäuremolekül ersetzt. Nach dieser Auffassung reagieren die aktivierten Chlorophyllmoleküle, die zur vollständigen Reduktion der Kohlensäure nötig sind, nicht gleichzeitig mit der Kohlensäure, sondern zeitlich hintereinander und reduzieren die Kohlensäure stufenweise. Entsprechend faßt man die Verbrennung der Glucose durch Sauerstoff

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

nicht als eine gleichzeitige Reaktion von 6 Molekülen Sauerstoff mit 1 Molekül Glucose auf, sondern als eine stufenweise Oxydation

Weiterhin mache ich von der Tatsache Gebrauch, daß bestrahltes Chlorophyll, gleichgültig ob man mit blauem oder grünem oder gelbem Licht bestrahlt, immer rot fluoresciert. Betrachten wir nun die Erzeugung fluorescierender und chemisch aktivierter Chlorophyllmoleküle als parallele Vorgänge, so wird jeder Absorptionsvorgang, unabhängig von der Farbe des erregenden Lichtes, immer den gleichen aktivierten Zustand des Chlorophylls hervorbringen. Dann ist die Zahl der Absorptionsvorgänge — das heißt die Zahl der absorbierten Quanten —, die zur Reduktion eines Kohlensäuremoleküls erforderlich sind, in den verschiedenen Spektralbezirken gleich, und die spezifische photochemische Wirkung muß sich mit der Wellenlänge so ändern, wie wir es beim Übergang von Rot zu Gelb finden und wie es das Einsteinsche Gesetz verlangt.

Diese Überlegungen zeigen, daß man die wesentlichsten Ergebnisse unserer Energiemessungen — die Größe der Ausbeute und die Änderung der Ausbeute mit der Wellenlänge — quantentheoretisch ungezwungen erklären kann, wenn man sich nur daran erinnert, daß die Kohlensäureassimilation ein Vorgang an Oberflächen ist.

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft Jahrg 60, 1927, H. 3, S. 755.

Sauerstoffübertragung durch Chlorophyll und das photochemische Äquivalentgesetz.

Von

Hans Gaffron.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. Januar 1927.)

Mit 2 Abbildungen

Löst man Chlorophyll in Aceton und belichtet. so wird Sauerstoff aufgenommen, wobei das Chlorophyll allmahlich unter Oxydation zerstört wird Durch Zusatz geeigneter Substanzen — welche die wirksame Strahlung nicht absorbieren — kann man die Sauerstoffaufnahme erheblich verstarken, die oxydative Zerstorung des Chlorophylls verhindern Solche Substanzen nennen wir Acceptoren Da der Acceptor oxydiert wird, wahrend der Farbstoff, der das Licht absorbiert, in der Bilanz unverandert bleibt, so kann man von einer photochemischen Sauerstoffübertragung sprechen, ein Ausdruck der nur die Bilanz, nicht den Mechanismus des Vorgangs charakterisieren soll Ich habe auf Anregung und unter Hilfe von Herrn OTTO WARBURG gemessen, wieviel Sauerstoff bei derartigen Reaktionen pro Calorie absorbierter Strahlung ubertragen wird

1. Methodik.

Die Strahlungsenergie wurde bolometrisch, die aufgenommene Sauerstoffmenge manometrisch gemessen[1] Immer waren die Chlorophyll-Losungen so konzentriert, daß die gesamte, in den Versuchstrog eingestrahlte Energie absorbiert wurde. Die absorbierte Energie war also gleich der eingestrahlten Die Belichtungszeit betrug 3 Min Den wahrend dieser Zeit eingestrahlten Energiemengen von etwa $^1/_{10}$ Gramm-Calorie entsprachen Manometerausschläge von 10—20 mm Die Fehler bei der bolometrischen Energiemessung (Kompensationsverfahren nach E WARBURG[2] betrugen 2% Etwa ebenso groß waren die Fehler bei der manometrischen Messung (Ablesung mit Kathetometer-Mikroskop), so daß der Fehler in dem Quotienten $\frac{\text{photochemische Wirkung}}{\text{absorbierte Strahlung}}$ keinesfalls 5% ubersteigt

[1] Vgl. O. WARBURG u. E NEGELEIN Zeitschr. physikal Chem 106. 198 1923

[2] WARBURG, E, G. LEITHAUSER, E HUPKA u. C. MULLER: Ann d Physik [4] 40, 609. 1913

Ich habe die photochemischen Wirkungen im Rot, Gelb, Grün und Blau gemessen. Als Lichtquelle diente für Rot (λ = 640—670 $\mu\mu$) ein Monochromator, für die übrigen Farben eine Quecksilberdampflampe, aus deren Strahlung die Wellenlängen λ = 578, 546 und 436 $\mu\mu$ isoliert wurden.

Wesentlich für meine Anordnung war, daß der photochemische Umsatz die Anfangskonzentrationen nicht merklich änderte. Dies wurde erreicht durch kurze Belichtungszeit und niedrige Strahlungsintensität.

2. Farbstoff, Lösungsmittel, Acceptor, Sauerstoff.

Als Farbstoff benutzte ich krystallisiertes Äthyl-chlorophyllid, das nach WILLSTÄTTER dargestellt worden war (vgl. experimentellen Teil). Besonderes Gewicht wurde auf die vollständige Abtrennung der gelben (photochemisch unwirksamen) Begleitpigmente gelegt.

Das zunächst als Lösungsmittel verwendete Wasser erwies sich als für solche Versuche ungeeignet. Denn in organischen Lösungsmitteln verschiedenster Art erhielt ich stets größere Ausbeuten. Besonders bewährte sich Aceton (KAHLBAUM „zur Analyse“). Es hat die Eigenschaft, viele Substanzen leicht zu lösen, ohne, wie das Wasser, die photochemische Wirkung zu stören.

Um einen geeigneten Acceptor zu finden, habe ich Versuche mit den verschiedensten Stoffen ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß viele organische Substanzen schon im Dunkeln durch molekularen Sauerstoff oxydiert werden, wenn man sie bei Zimmertemperatur in Aceton löst. Solche Stoffe waren für meine Zwecke ungeeignet. Gut brauchbar als Acceptor erwies sich Allylthioharnstoff (Thiosinamin), $NH_2 \cdot SC \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CH : CH_2$, der weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Farbstoff eine meßbare Dunkel-Oxydation zeigte und den ich für alle quantitativen Versuche verwendet habe.

Die Photoxydation greift am Schwefel an und liefert neben komplizierteren Oxydationsprodukten, Schwefeldioxyd. Läßt man den Prozeß so lange weiterlaufen, bis die Reaktionsgeschwindigkeit sehr klein geworden ist, so kommen im allgemeinen $1\frac{1}{2}$ Mol Sauerstoff auf 1 Mol Thiosinamin. Dabei wird $\frac{1}{2}$ Mol Schwefeldioxyd frei. Das SO_2 wird dann weiter, wie bekannt, zu SO_3 oxydiert[1].

Den Gasraum der Versuchsgefäße füllte ich mit Luft. Bei einem Gesamtdruck von 760 mm Hg und 20° war dann der Partialdruck des Sauerstoffs (760—180) · 20,9/1000 = 122 mm Hg, und die Konzentration des Sauerstoffs im Aceton (mit $\alpha_{O_2}^{Aceton} = 0,22$)[2]

$$\frac{122/760 \times 0{,}22 \cdot 1000}{22400} = 1{,}6 \cdot 10^{-3}\ \text{Mole/Liter}$$

[1] NOACK, K.: Naturwiss. 14, 385, 1926.
[2] Aus G. LEVI: Gazz. chim. Ital. 31 II, 513, 1901.

3. Ergebnisse.

Ich bezeichne nach E. Warburg[1] die von der Einheit der absorbierten Strahlungsenergie hervorgebrachte chemische Wirkung mit φ und benutze als Einheit der photochemischen Wirkung W den cmm Sauerstoff, als Einheit der absorbierten Strahlungsenergie E die Gramm-Calorie. Dann ist:

$$\varphi = \frac{W}{E}\,[\text{cmm/cal}].$$

Ferner bezeichne ich die Konzentration des Chlorophylls mit c_F und die Konzentration des Acceptors mit c_A, beide in Molen/Liter.

Tabelle 1 enthält die Ergebnisse von 3 Versuchsreihen.

Tabelle 1

$c_A = 7{,}5 \times 10^{-1}$, $c_F = 1{,}54 \times 10^{-3}$ Temperatur 18°.

Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	Versuch 1 φ	Versuch 2 φ	Versuch 3 φ	Mittelwert von φ
rot	655 (mittlere)	517	514	474	502
gelb	578	478	450	456	461
grün	546	440	409	408	419
blau	436	367	337	313	339

Tabelle 2 enthält einige Werte für je zwei verschiedene Intensitäten. Sie zeigt, daß φ unabhängig von der Intensität ist[2].

Tabelle 2

$c_A = 7{,}5 \times 10^{-1}$, $c_F = 1{,}54 \times 10^{-3}$ Temperatur 18°.

Versuchs-Nr.	Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	In 5 Min. in den Trog eingestrahlte Energie E (cal)	φ
4	gelb	578	0,0574	444
			0,121	450
5	blau	436	0,0487	302
			0,0964	303

4. Das Einsteinsche Äquivalentgesetz.

Zur Prüfung des photochemischen Äquivalentgesetzes ist es notwendig, eine Annahme hinsichtlich des chemischen Vorganges zu machen, der der Zahl der absorbierten Quanten äquivalent sein soll. Die ein-

[1] Zeitschr. Elektrochem. 26, 54. 1920.

[2] Die Versuche sind fortlaufend numeriert. Die zugehörigen Messungen finden sich unter der gleichen Ziffer im Protokoll am Schluß der Arbeit.

fachste Annahme ist hier, daß für jedes absorbierte Lichtquantum ein Molekül Sauerstoff aufgenommen wird. φ_0 der Tabelle 3 ist die so berechnete photochemische Wirkung, der φ, die gefundene photochemische Wirkung, gegenübergestellt ist.

Wie man sieht, stimmen die berechneten und die gefundenen Werte innerhalb der Meßfehler überein. Im Rot, Gelb, Grün und Blau wird für jedes absorbierte Lichtquantum 1 Molekül Sauerstoff aufgenommen.

Tabelle 3

Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	Valenzstrahlung $N_0\,h\nu$ (cal)	φ_0 ber $\left(\varphi_0 = \frac{22400 \cdot 10^3}{N_0\,h\nu}\right)$ (cmm/cal)	φ gef. $(\varphi = W/E)$ (cmm/cal)	φ/φ_0
rot	655	43300	517	502	0,97
gelb	578	49200	456	461	1,01
grün	546	51900	431	419	0,97
blau	436	65000	344	339	0,99

Es liegt hier also ein Fall vor, in dem das EINSTEINsche photochemische Äquivalentgesetz[1] für einen relativ großen Spektralbezirk geprüft und bestätigt wurde, was soweit ich sehe bisher nur in den ersten grundlegenden Versuchen von E. WARBURG[2] über die Photolyse von Brom- und Jodwasserstoffgas geschehen ist[3].

Auf zwei Punkte möchte ich aufmerksam machen. Der erste betrifft die Absorption des Chlorophylls. Chlorophyll absorbiert in dem von mir untersuchten Spektralbezirk sehr verschieden stark, am stärksten im Blau, am schwächsten im Grün. Und zwar im Blau 23mal stärker als im Grün. Die bekannte scharfe Absorptionsbande des Chlorophylls liegt im Rot bei $\lambda = 660 - 680\,\mu\mu$. Meine Versuche zeigen, daß keine Beziehungen zwischen Stärke der Absorption und photochemischer

[1] Ann. d. Physik [4] 37, 832, 38, 881 1912; Journ. Physique 3, 277 1913. — Verhandl. Dtsch. Physikal. Ges. 18, 318 1916; vgl. hierzu J. STARK, Ann. Physik [4] 38, 467 1912.

[2] Zeitschr. Elektrochem. 26, 54 1920, 27, 133 1921; Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wissensch. 1912, 216; 1913, 644.

[3] Über Quantentheorie und photochemische Prozesse vgl. auch die wichtigen Arbeiten von W. NERNST u. W. NODDACK, Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss. 1923, 110—115; dieselben, Physikal. Zeitschr. 21, 605. 1920. L. PUSCH, Zeitschr. Elektrochem. 24, 336 1918. H. GRUSS, Zeitschr. Elektrochem. 29, 144 1923; J. EGGERT u. W. NODDACK, Zeitschr. Physik 20, 299 1923; Naturwiss. 15, 57 1927; F. WEIGERT u. L. BRODMANN, Zeitschr. physikal. Chem. 120, 24 1926; CHR. WINTHER, Zeitschr. physikal. Chem. 120, 32 1926; K. F. BONHOEFFER, Zeitschr. Physik 13, 94 1923, M. BODENSTEIN, Zeitschr. physikal. Chem. 85, 229. 1913; E. J. BOWEN: Journ. chem. Soc. London 123, 1199, 2328 1923. — Im übrigen verweise ich auf den Band 120. 1926 der Zeitschr. physikal. Chem., der einen wohl vollständigen Überblick über die bis 1925 vorliegenden Arbeiten gibt.

Wirkung besteht, vorausgesetzt, daß die Absorption vollständig ist Natürlich muß dies so sein. wenn das Äquivalentgesetz gilt, trotzdem ist es erwähnenswert, weil es im Gegensatz zu vielen in der Literatur geäußerten Meinungen steht

Der zweite Punkt betrifft die Kohlensäureassimilation Bestimmt man φ bei der Assimilation der Kohlensäure, so findet man, wie O. WARBURG und E NEGELEIN gezeigt haben, daß φ vom Rot zum Blau hin abnimmt. WARBURG und NEGELEIN haben diesen Gang mit der Wellenlänge quantentheoretisch erklärt und aus ihren Versuchen geschlossen, daß jedes von dem Chlorophyll absorbierte Quantum, unabhängig von seiner Energie, in der lebenden Pflanze die gleiche chemische Wirkung hervorbringt. Meine Versuche beweisen, daß dieser Schluß richtig war. Denn so verschieden die Sekundärreaktionen bei der Kohlensäureassimilation und bei der photochemischen Sauerstoffübertragung auch sein mögen, so unzweifelhaft ist es, daß die photochemischen Primärvorgänge in beiden Fällen die gleichen sind

5. Einfluß der Acceptorkonzentration.

In den angeführten Versuchen war die Chlorophyllkonzentration $c_F = 1{,}54 \cdot 10^{-3}$ Mole/Liter, die Acceptorkonzentration $c_A = 750 \cdot 10^{-3}$ Mole/Liter Halt man die Chlorophyllkonzentration konstant, geht aber mit der Acceptorkonzentration herunter, so sinkt die photochemische Wirkung Tabelle 4 enthält ein Versuchsbeispiel, in dem — für die Wellenlänge $\lambda = 578\ \mu\mu$ — der Einfluß der Acceptorkonzentration c_A gemessen wurde und zwar für c_A Werte zwischen $0{,}75 \cdot 10^{-3}$ und $75{,}0 \cdot 10^{-3}$

Abb 1

Aus Abb 1 erkennt man daß nur für große Werte von c_A das Äquivalentgesetz erfüllt ist So entsteht die Frage, wie sich die photochemische Wirkung mit der Wellenlänge unter Bedingungen ändert, unter denen φ kleiner ist, als es das Äquivalentgesetz verlangt Zur Entscheidung wählte ich eine Acceptorkonzentration, bei der im Gelb $\varphi : \varphi_0$ ungefähr gleich 0,5 war und bestimmte φ für 4 verschiedene Wellenlängen Das Ergebnis ist in Tabelle 5 zusammengestellt

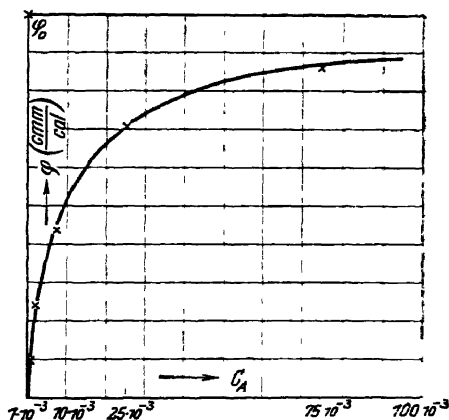



Tabelle 4. *Versuch Nr. 6.* $\lambda = 578\ \mu\mu$, $c_F = 1{,}54 \cdot 10^{-3}$. Temperatur 18°. Gasraum Luft.

c_A	φ (cmm/cal)	φ/φ_0
$0{,}75 \cdot 10^{-3}$	48	0,10
$1{,}88 \cdot 10^{-3}$	109	0,24
$7{,}5 \cdot 10^{-3}$	199	0,44
$25{,}0 \cdot 10^{-3}$	322	0,71
$75{,}0 \cdot 10^{-3}$	392	0,86

Aus Tabelle 5 folgt, daß auch dann, wenn das Äquivalentgesetz nicht erfüllt ist, der von der Quantentheorie verlangte Gang mit der Wellenlänge gefunden wird. Denn φ/φ_0 ist in allen 4 Spektralbezirken

Tabelle 5. *Versuch Nr. 7.* $c_A = 10 \times 10^{-3}$, $c_F = 1{,}54 \times 10^{-3}$. Temperatur 18°. Gasraum Luft.

Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	φ (cmm/cal)	φ_0 (cmm/cal)	φ/φ_0
rot	655	274	517	0,53
gelb	578	248	456	0,54
grün	546	240	431	0,56
blau	436	186	344	0,54

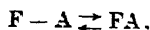
innerhalb der Fehlergrenzen gleich, oder — was dasselbe besagt — die photochemischen Wirkungen verhalten sich untereinander wie die zugehörigen Wellenlängen.

	$\frac{\varphi \text{ rot}}{\varphi \text{ gelb}}$	$\frac{\varphi \text{ gelb}}{\varphi \text{ grün}}$	$\frac{\varphi \text{ gelb}}{\varphi \text{ blau}}$	$\frac{\varphi \text{ grün}}{\varphi \text{ blau}}$	$\frac{\varphi \text{ rot}}{\varphi \text{ blau}}$
berechnet	1,13	1,06	1,32	1,25	1,50
gefunden	1,10	1,03	1,33	1,29	1,47

6. Das Verhältnis c_A/c_F [1*].

Nach den vorstehenden Versuchen steigt die photochemische Wirkung φ bei konstanter Farbstoffkonzentration c_F mit der Acceptorkonzentration c_A und erreicht für große Werte von c_A den Grenzwert φ_0.

Zunächst liegt es nahe, die Wirkung von c_A auf φ durch die Annahme zu erklären, daß sich der (unbestrahlte) Farbstoff F mit dem Acceptor A verbindet

$$F + A \rightleftarrows FA,$$

und daß nur die verbundenen Farbstoffmoleküle photochemisch reagieren

$$\frac{\varphi}{\varphi_0} = \frac{c'_F}{c_F},$$

wo c'_F die Konzentration an gebundenem Farbstoff, c_F die Gesamtkonzentration an Farbstoff bedeutet.

[1*] Diesen Abschnitt verfaßte Herr O. Warburg.

Ist K die Affinitätskonstante der Reaktion (1), c_A die Konzentration an freiem Acceptor, so ist

$$\frac{c'_F}{(c_F - c'_F) \times c_A} = K, \tag{3}$$

und nach (2) und (3)

$$\frac{\varphi}{\varphi_0} = \frac{c'_F}{c_F} = \frac{K c_A}{1 + K c_A} \tag{4}$$

Macht man c_A groß gegen c_F, so ist c_A sehr nahe gleich der Gesamtkonzentration an Acceptor. Dann ist c'_F/c_F und damit φ/φ_0 vollständig durch die Gesamtkonzentration an Acceptor bestimmt, insbesondere unabhängig von der Farbstoffkonzentration c_F. Die Prufung dieser Konsequenz der Gleichung (4) ergab.

(λ 436)	c_F	c_A	φ/φ_0
Versuch Nr. 7 . .	$1{,}54 \times 10^{-3}$	10×10^{-3}	0.5
„ „ 8 .	$1{,}54 \times 10^{-4}$	10×10^{-3}	0.94.

Wurde also bei großem und konstantem c_A die Farbstoffkonzentration c_F auf $^1/_{10}$ vermindert, so blieb die photochemische Wirkung nicht konstant, sondern stieg auf fast das Doppelte. Es folgt daraus, daß die Gleichungen (1) bis (4) in Widerspruch zu den Tatsachen stehen, und an diesem Schluß andert sich nichts, wenn wir in Gleichung (1) statt eines Acceptormoleküles mehrere Acceptormolekule mit dem Farbstoff reagieren lassen. Offenbar ist es nicht moglich, den Einfluß von c_A und c_F auf φ durch Annahme einer dissoziierenden Farbstoffacceptor-Verbindung zu erklaren.

Dann sind die Tatsachen. Farbstoff und Acceptor sind frei in der Losung. Überschüssiger Farbstoff stort die photochemische Reaktion, der Acceptor begunstigt sie, das Losungsmittel ist indifferent. Folgende Gleichung, in der K eine empirische Konstante bedeutet, faßt das Ergebnis der Messungen zusammen

$$\varphi/\varphi_0 = \frac{\frac{c_A}{c_F} \times K}{\frac{c_A}{c_F} \times K + 1}. \tag{5}$$

Abb 2

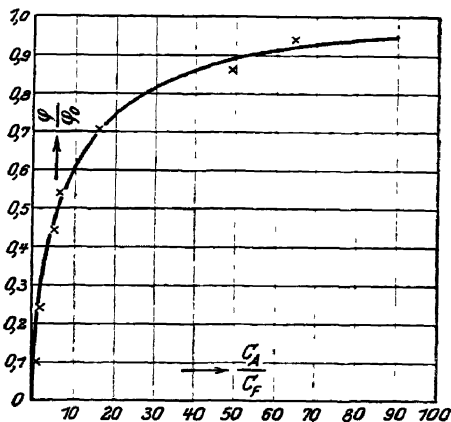
Eine wesentliche Eigenschaft der Gleichung (5) ist, daß φ/φ_0 durch c_A/c_F vollständig bestimmt ist. Die Tabelle 6 und Abb 2 enthält eine Zusammenstellung aller Versuche, in denen c_A bei konstantem c_F und c_F bei konstantem c_A

variiert wurde. Was die Konstante K der Gleichung (5) anbetrifft, so schwankt sie um einen Mittelwert von 0,20 (von 0,14—0,25) Diese Schwankungen sind unbedeutend, wenn man bedenkt, daß $c_A \cdot c_F$ von 0,49 bis 65, also um das 140fache variiert worden ist.

Tabelle 6

Vers.-Nr.	c_A		c_F		$c_A \cdot c_F$	φ/φ_0	K
	0,75	10^{-3}	1,54	10^{-3}	0,49	0,105	0,24
6	1,88	10^{-3}	1,54	10^{-3}	1,23	0,24	0,255
	7,5	10^{-3}	1,54	10^{-3}	4,9	0,44	0,16
7	10,0	10^{-3}	1,54	10^{-3}	6,5	0,54	0,18
6	25,0	10^{-3}	1,54	10^{-3}	16,2	0,71	0,15
	75,0	10^{-3}	1,54	10^{-3}	49	0,86	0,14
8	10,0	10^{-3}	0,154	10^{-3}	65	0,94	0,23
						Mittel	0,195

Bemerkenswert ist, daß die empirische Konstante K der Gleichung (5) dem Verhältnis der Molekulargewichte von Acceptor und Farbstoff sehr nahe kommt. Ist das Molekulargewicht des Allylthioharnstoffs 116, das des Äthylchlorophyllids 652, so ist $116/652 = 0,18$, während für K als Mittelwert 0,20 gefunden wurde.

7. Die Photoxydation des Chlorophylls.

Wie in der Einleitung erwähnt, oxydiert sich Chlorophyll bei Belichtung in acceptorfreier Lösung, ein Vorgang, über den viel gearbeitet worden ist[1]. Die Oxydationsgeschwindigkeit ist hierbei aber 100mal kleiner als bei der „Sauerstoffübertragung". Für λ 578 $\mu\mu$ erhielt ich ein φ von 4 ($\varphi/\varphi_0 < 0,01$!) Frische Lösungen von Chlorophyll in Aceton (Vers. 9) geben allerdings etwas höhere Werte. Diese beruhen jedoch auf den Spuren von Verunreinigungen, die auch in reinem Aceton vorhanden sind.

8. Photochemische Wirkung des Hämatoporphyrins.

Ähnlich wie Chlorophyll verhalten sich viele andere fluorescierende Farbstoffe[2]. Zwei Versuche mit Hämatoporphyrin und Allylthioharnstoff, beide gelöst in Aceton, seien im folgenden angeführt. Die Versuche lassen erkennen, daß sich die photochemischen Wirkungen im Gelb und Blau wie die Wellenlängen verhalten und weiter, daß das Äquivalentgesetz erfüllt ist (Tabelle 7).

---

[1] WILLSTÄTTER u. STOLL: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin: J. Springer 1918. — WAGER, H.: Proceed. Roy. Soc., Ser. B 87, 386. 1914. — NOACK, K.: Naturwiss. 14, 385. 1926. — JORGENSEN, J. u. F. KIDD: Proceed. of roy. soc. of London B. 89, 342. 1926.

[2] Vgl. Biochem. Zeitschr. 179, 161. 1926. Ferner W. HAUSMANN: Biochem. Zeitschr. 15, 12. 1909.

Tabelle 7.
$c_A = 2{,}6 \times 10^{-1}$, $c_F = 1{,}1 \times 10^{-3}$. Temperatur 19°. Gasraum. Luft.

Farbe	Wellenlänge $\mu\mu$	Vers.-Nr. 10 φ	Vers.-Nr. 11 φ	Mittelwert von φ	φ/φ_0
gelb	478	462	443	452	0,99
blau	436	350	332	341	0,99
Quotient gelb/blau	1,32	1,32	1,33		

Beschreibung der Versuche.

Die Versuchsanordnung entspricht im wesentlichen der von O. Warburg und E. Negelein[1] beschriebenen. Abweichend von der früheren Anordnung wird zur bolometrischen Energiemessung das Licht direkt aus dem Glasthermostaten in das Bolometer gespiegelt Hierzu dient ein zur Strahlungsrichtung senkrecht stehender, um seine lotrechte Achse drehbarer Spiegel. Er wird in den Thermostaten hinabgelassen, verdunkelt den Versuchstrog und wirft die Strahlung durch die planparallele Wand des Thermostaten zuruck in das ein wenig seitlich davor aufgestellte Bolometer

a) Berechnung von E und W.

I Wenn ω der abgelesene Kompensationswiderstand ist, so wird die pro Sekunde in den Versuchstrog eingestrahlte Energie bestimmt durch

$$e = 1{,}18 \times 22{,}6 \times 10^{-6} \times 4{,}62 \times 4030/\omega$$

Hierin ist 1,18 ein Korrektionsfaktor, $22{,}6 \times 10^{-6}$ bedeutet die Intensität in 1 m Entfernung der Hefner-Lampe[2], 4,62 ist die bestrahlte Bolometerfläche (qcm), 4030 die Große des Kompensationswiderstandes bei der Eichung des Bolometers (Ω) — Bei einer Bestrahlungsdauer von 5 Min = 300 Sek beträgt die in den Trog gelangte Energie

$$E = 1{,}18 \times 22{,}6 \times 10^{-6} \times 4{,}62 \times 4030/\omega \times 300 \quad 149\,\omega$$

II. Es ist

$$h \times K_{O_2} = W,$$

wenn h die manometrisch gemessene Druckdifferenz in mm K_{O_2} die „Gefaß-Konstante" fur Sauerstoff, W die absorbierten cmm O_2 bedeutet

K_{O_2} ist gegeben durch

$$\left(1 - \frac{\frac{A}{2} \times \frac{273}{T}}{\frac{V_{g'} \frac{273}{T} - V_{f'}\,\alpha'}{Po}}\right) \left(\frac{V_g \frac{273}{T} - V_f\,\alpha}{Po} - \frac{A}{2} \times \frac{273}{T}\right)$$

---

[1] Zeitschr. physikal. Chem. **106**, 198. 1923.
[2] Nach W. Gerlach: Physikal. Zeitschr. **14**, 577. 1903

Hierin ist

A = Querschnitt der Capillare in qmm,
Vg = Volumen des Gasraumes im Versuchstrog in cmm,
Vg' = „ „ „ „ Kontrolltrog „ „
Vf = „ der Flüssigkeit „ Versuchstrog „ „
Vf' = „ „ „ „ Kontrolltrog „ „
P_0 = Normaldruck in mm Sperrflüssigkeit (Capronsäure)
T = absol Versuchstemperatur,
α = BUNSENscher Absorptionskoeffizient für Sauerstoff,
α' = „ „ des Gases im Kontrolltrog

($Vg = V - Vf$, wenn V das Volum des Versuchstroges ist, ebenso $Vg' = V' - Vf'$)

Die Zahlenwerte sind: $A = 0{,}158$, $V = 53220$; $V' = 58400$, $Vf = 30000$ (35000); $Vf' = 30000$ (35000); $P_0 = 11160$; $T = 291$; $\alpha = 0{,}224$[1]; $\alpha' = \alpha$ (der Fehler, den man begeht, wenn man $\alpha' = \alpha$ setzt, ist zu vernachlässigen)

Für eine Versuchstemperatur von 18° und $Vf = Vf' =$ 30 ccm Aceton, ist $K_{O_2} = 2{,}70$; Vf für $= Vf' = 35$ ccm ist $K_{O_2} = 2{,}37$. Das Volumen V und V' der Tröge des Differentialmanometers wurde durch Auswägen mit Wasser bzw Quecksilber ermittelt[2].

b) φ_0.

Die Absorption von einem Lichtquant habe die Reaktion mit 1 Molekül Sauerstoff zur Folge Dann ist für den Umsatz von 1 Mol Sauerstoff 1 „Mol Quanten" (= Valenzstrahlung = $N_0 h \nu$) erforderlich Drücken wir das Mol Sauerstoff in cmm, die Valenzstrahlung in cal aus, so ist

$$\varphi_0 = \frac{22400 \times 10^3}{N_0 h \nu} \text{ [cmm cal]}$$

(N_0. Zahl der Moleküle pro Mol, h PLANCKsches Wirkungsquantum in cal/sec, ν Frequenz der absorbierten Strahlung) Vgl Tabelle 3

c) *Isolierung der einzelnen Wellenlängen.*

Aus dem Licht der Quecksilberlampe wurde das Ultraviolett durch 2proz Chininlösung, das Rot durch Kupfersulfat (6%) weggenommen Dazu kam zur Isolierung der blauen Linie λ 436 $\mu\mu$ eine Cuvette mit Säure-Rhodamin 0,003%, desgl $^1/_{10}$-molar Kupfersulfat-Ammoniak Für die Linie λ 546 $\mu\mu$ grün wurde 0,02% Tartrazin und ein Didymglas von SCHOTT u Gen gebraucht Zur Isolierung der gelben Linie λ 578 $\mu\mu$ dienten 0,02% Tartrazin und 0,02% Erythrosin in einer Cuvette Die Schichtdicke der Farblösungen betrug 1 cm

Der Monochromator lieferte nach Vorschalten einer Rotscheibe ein schmales Lichtbündel von λ 640—670 $\mu\mu$ Mittlere Wellenlänge also 655 $\mu\mu$

[1] Aus G LEVI Gazz chim Ital 31, II 513 1907

[2] Eine Ableitung der Formel für das Differential-Manometer findet sich in O WARBURG: „Über den Stoffwechsel der Tumoren Berlin. Julius Springer. 1926.

d) Gewinnung des Chlorophylls usw.

Als Ausgangsmaterial diente Aegopodium Podagraria (Giersch), auf das uns in liebenswürdiger Weise Herr Prof. KOLKWITZ aufmerksam gemacht hatte. Die Darstellung erfolgte nach der von WILLSTÄTTER[1] gegebenen Methode für krystallisiertes Äthylchlorophyllid. Die frischen grünen Blätter werden auf Drahtgittern im Dunkeln an der Luft möglichst rasch getrocknet. Die Blätter werden entstielt, im Mörser zerkleinert und mit der Hand zerrieben. Man läßt 200 g Blattmehl mit 450 450 ccm Alkohol und 20 ccm n-Ammoniak im Pulverglas 2 Tage stehen, versetzt sodann mit ca. 1 l Aceton und saugt nach 2 Stdn. ab. Das Blattmehl wird auf der Nutsche so lange mit Aceton extrahiert, bis das Filtrat hellgrün abfließt. Man gibt zu dem Filtrat viel Talk (50—100 g) und läßt langsam unter Umrühren das gleiche Volumen Wasser zufließen. Nach 2stünd. Stehen wird abgesaugt und der Talk mit etwas 50proz. Alkohol und mit 50proz. Aceton gewaschen. Jetzt wird die Talkschicht trocken gesaugt und mehrmals mit Petroläther zur Lösung des Carotens behandelt. Bei der nun folgenden Extraktion des Xanthophylls mit kleinen Mengen Äther geht etwas Chlorophyllid verloren, da dieses in Äther löslich ist. Der Talk, der das Äthylchlorophyllid enthält, wird auf der Zentrifuge wiederholt mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus der filtrierten alkoholischen Lösung fällt man durch vorsichtiges Verdünnen mit destilliertem Wasser das Äthylchlorophyllid in kleinen dreieckigen Krystallen (Mikroskop). Die abzentrifugierten gewaschenen und getrockneten Krystalle werden dann nochmals auf der Zentrifuge mit kleinen Mengen Petroläther und Äther behandelt, um die letzten Spuren der gelben Pigmente zu entfernen, und endlich im Vakuum getrocknet.

Das aus Hämin mit Eisessig-Bromwasserstoff dargestellte Hämatoporphyrin wird mehrmals aus Natronlauge umgefällt und sorgfältig gewaschen. Das so gewonnene amorphe Hämatoporphyrin ist in Aceton leicht mit schöner roter Farbe löslich.

e) Die Versuchslösung.

Allylthioharnstoff (Thiosinamin) ist in Aceton leicht löslich. Das käufliche Präparat gibt gelblich gefärbte Lösungen und muß daher aus nicht zu wenig Aceton 2—3mal umkrystallisiert werden.

Um bei einer Chlorophyllkonzentration von 0,1% photochemische Äquivalenz zu finden, muß die Versuchslösung etwa 6—12% Thiosinamin enthalten. In den Versuchen Nr. 1—4 war die Zusammen-

---

[1] WILLSTÄTTER, R. u. A. STOLL: „Untersuchungen über Chlorophyll", S. 198. Berlin: Julius Springer, 1913.

Vers.-Nr.	Vf, Vf' in ccm	c_A	c_F	K_{O_2}	λ $\mu\mu$	h mm	W cmm	ω Ω	E cal	φ cmm/cal
1	Vf = 30, Vf' = 33	$7{,}5 \times 10^{-1}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	436	8,1	21,9	2500	0,0596	367
					546	9,9	26,7	2460	0,0606	440
					578	10,0	27,0	2640	0,0565	478
					655	12,4	33,5	2300	0,0648	517
2	Vf = 30, Vf' = 33	$7{,}5 \times 10^{-1}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	436	7,35	10,8	2540	0,0587	337
					546	8,95	24,15	2520	0,0592	409
					578	20,2	54,5	1230	0,121	450
					655	11,35	30,6	2500	0,0596	514
3	Vf = 30, Vf' = 33	$7{,}5 \times 10^{-1}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	436	7,1	19,2	2430	0,0614	313
					546	9,0	24,3	2500	0,0596	408
					578	9,8	26,4	2570	0,0580	456
					655	12,6	34,0	2080	0,0717	474
4	Vf = 30, Vf' = 33	$7{,}5 \times 10^{-1}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	578	20,2	54,5	1230	0,121	450
					578	9,4	25,4	2600	0,0574	444
5	Vf = Vf' = 35	$2{,}6 \times 10^{-1}$	$0{,}7 \times 10^{-3}$	2,37	436	12,3	29,2	2470	0,0964	303
					436	6,2	14,7	4890	0,0487	302
6	Vf = Vf' = 30	$0{,}75 \times 10^{-3}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	578	2,15	5,8	1230	0,121	48
		$1{,}88 \times 10^{-3}$			578	5,0	13,5	1200	0,124	109
		$7{,}5 \times 10^{-3}$			578	9,2	24,8	1190	0,125	199
		$25{,}0 \times 10^{-3}$			578	14,8	40,0	1200	0,124	322
		$75{,}0 \times 10^{-3}$			578	18	48,6	1200	0,124	392
7	Vf = Vf' = 30	$1{,}00 \times 10^{-2}$	$1{,}54 \times 10^{-3}$	2,70	436	7,3	19,7	1400	0,106	186
					546	8,9	24,0	1500	0,10	240
					578	9,2	24,8	1500	0,10	248
					655	13,7	37,0	1100	0,135	274
8	Vf = Vf' = 30	$1{,}00 \times 10^{-2}$	$0{,}154 \times 10^{-3}$	2,70	436	12,8	34,5	1400	0,106	325
9	Vf = Vf' = 30	—	1×10^{-3}	2,70	578	1,45	3,91	2240	0,0665	59
					436	1,2	3,24	1980	0,0754	43
10	Vf = 30, Vf' = 35	$2{,}6 \times 10^{-1}$	$1{,}1 \times 10^{-3}$	2,69	436	12,7	34,1	2440	0,0975	350 } Hämatoporphyrin
					578	18,7	50,0	2190	0,108	462 } Hämatoporphyrin
11	Vf = 30, Vf' = 35	$2{,}6 \times 10^{-1}$	$1{,}1 \times 10^{-3}$	2,69	436	11,8	31,7	2490	0,0956	332 } Hämatoporphyrin
					578	17,8	47,9	2190	0,108	443 } Hämatoporphyrin

setzung folgende: 8,6 g Thiosinamin und 0,1 g Äthyl-chlorophyllid wurden in 100 ccm Aceton aufgelöst, das 1% Wasser und 2% Pyridin enthielt. Der Pyridin-Zusatz hat den Sinn, die „Lebensdauer" der Lösung zu verlängern. Man kann mehrere Versuchsreihen mit der gleichen Lösung ausführen, ohne befürchten zu müssen, daß die Ausbeute sinkt, was in pyridinfreier Lösung manchmal der Fall war. Auf die photochemische Äquivalenz hat der Zusatz keinen Einfluß. (Versuche Nr. 10 und 11, mit Hamotoporphyrin, sind in reinem wasserfreiem Aceton ausgeführt worden.)

Nach dem Einfüllen der Lösung[1] in den Versuchstrog und der gleichen Menge reinen Acetons in den Kontrolltrog des Differentialmanometers dauert es bei dem hohen Dampfdruck des Acetons (180 mm; 20°) sehr lange, bis die Druckschwankungen im Manometer unmerklich geworden sind. Die Ausgleichszeit betragt 1—2 Stdn., wahrend der zuerst mit offenen, dann mit geschlossenen Hahnen geschüttelt wird

f) Protokoll der Messungen (Tabelle auf S. 496)

Es bedeutet: Vf Volumen der Flussigkeit im Versuchstrog, Vf' Volumen der Flussigkeit (Aceton) im Kontrolltrog, c_A Konzentration des Acceptors, c_F Konzentration des Farbstoffes (Versuch 1—9 Chlorophyll, Versuch 10 und 11 Hämatoporphyrin), K_{O_2} die Gefäßkonstante fur Sauerstoff, λ die Wellenlänge in $\mu\mu$, h die abgelesene Druckdifferenz in mm, W ($= h \cdot K_{O_2}$) den verbrauchten Sauerstoff in cmm, ω den gemessenen Widerstand, E die eingestrahlte Energie (in Versuch 1—9 ist $E = 149/\omega$, in Versuch 10—11 ist $E = 238/\omega$), α die photochemische Wirkung (W/E) Temperatur 18°, Belichtungszeit 5 Min

Fur reiche Belehrung und freundlichste Unterstutzung bin ich Herrn Prof O Warburg ganz besonders verpflichtet Ihm, sowie Herrn E Negelein, möchte ich auch hier meinen herzlichsten Dank sagen Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danke ich fur die Gewahrung von Mitteln zur Durchfuhrung dieser Arbeit

[1] Es empfiehlt sich, die fertige Losung erst 24 Stdn im Dunkeln stehen zu lassen

III. Katalytische Wirkungen wachsender Zellen.

Die Naturwissenschaften 25, 1, 1927

Über den heutigen Stand des Carcinomproblems.

Von
Otto Warburg.

I.

Krebs entsteht unter dem Einfluß der verschiedenartigsten außeren Ursachen. Fast kann man sagen, daß jede chronische Schadigung, die nicht stark genug ist, um Zellen zu toten, Krebs erzeugt Hierbei sind die Wirkungen streng lokal, an der geschadigten Stelle und nur an dieser entsteht der Krebs Dies lehren unzahlige klinische Erfahrungen, aber am einwandfreisten beweist es die Entdeckung von YAMAGIVA, daß man durch Teerung der Haut kunstlich Krebs erzeugen kann.

Trotz Teerkrebs und Rontgenstrahlenkrebs gibt es noch heute Infektionstheorien, deren neueste die Theorie von Dr GYE ist Nach GYE existiert ein ubiquitarer und ultramikroskopischer Organismus, der in Verbindung mit einem unbelebten Faktor den Krebs erzeugt Die Theorie von GYE ist logisch aufgebaut, aber, soviel ich sehen kann, experimentell nicht begrundet Es ist richtig, daß GYE eine aus ROUS-Sarkomen gewonnene Flüssigkeit auf das 10^{15}fache verdunnte, aber es ist nicht richtig, daß GYE, wie man oft in Referaten liest, mit diesen verdunnten Flussigkeiten Tumoren erzeugen konnte Zur Erzeugung von ROUS-Sarkomen war vielmehr in GYES Versuchen immer der unverdunnte Sarkomextrakt notwendig Deshalb geht die Arbeit von GYE experimentell nicht wesentlich uber die Arbeit von PEYTON ROUS aus dem Jahre 1911 hinaus

Weniger streng als die Theorie von GYE ist eine andere Infektionstheorie, die an die Tumefaciens-Versuche von IRWIN SMITH und von F BLUMENTHAL anknupft Es wird zugegeben daß Krebs auch ohne Mitwirkung eines korperfremden Organismus entsteht, aber es wird zur Diskussion gestellt, ob unter den krebserregenden Reizen die bakteriellen nicht die haufigsten seien Je haufiger die bakteriellen Reize waren und je spezifischer die Bakterienarten, von denen sie ausgingen um so mehr wäre der Krebs eine Infektionskrankheit, zwar nicht in dem strengen Sinn von PASTEUR, aber doch fur den praktischen Mediziner Was hier zur Diskussion gestellt wird, ist eine Frage der Krebsstatistik Ich kann nicht finden, daß sie zugunsten der Theorie spricht

Halt man sich an die Tatsachen, so gibt es weder einen spezifischen Krebserreger, noch uberwiegen unter den krebserregenden Ursachen die bakteriellen. Dies ist das wichtigste, wenn auch negative Ergebnis einer Epoche, in der man versuchte, die Methoden der Bakteriologie und bakteriellen Immunitat auf das Carcinomproblem anzuwenden.

II.

Wenn der Krebs keine Infektionskrankheit ist, so ist das Carcinomproblem eine zellphysiologisches Problem im engeren Sinn, und die Carcinomforschung wird sich in dem Maße entwickeln, als sich die Physiologie der Korperzellen entwickelt. Es sind also die Methoden zur physiologischen Untersuchung von Korperzellen, auf die es ankommt. Solche Methoden sind in den letzten Jahren ausgearbeitet und auf das Carcinomproblem angewendet worden.

Über den Angriffspunkt sei einiges vorausgeschickt Wir sprechen in der Physiologie von energieliefernden chemischen Reaktionen und meinen damit Reaktionen, die die treibenden Krafte für die Tatigkeit der Zelle liefern. Wir unterscheiden sie von anderen Reaktionen, bei denen zwar auch Energie frei wird, deren Energie aber von der Zelle nicht ausgenutzt werden kann Zu der ersten Gruppe gehoren die Sauerstoffatmung und die Gärungen, zu der zweiten Gruppe alle übrigen Reaktionen, im besonderen die Hydrolysen, wie die hydrolytische Eiweiß-, Fett- Polysaccharidspaltung

Man kann nicht sagen, daß die Hydrolysen unwichtiger sind, als die energieliefernden Reaktionen Aber sie sind vorbereitende Reaktionen und stehen als solche in keinem direkten Zusammenhang mit der Tatigkeit der Zelle. Deshalb sind die energieliefernden Reaktionen physiologisch interessanter Es ist das Gebiet der energieliefernden Reaktionen, auf dem das Carcinomproblem angegriffen worden ist, und wenn im folgenden von dem „Stoffwechsel" der Carcinomzelle die Rede ist, so sind immer nur die energieliefernden chemischen Reaktionen gemeint.

III.

Untersucht man in vitro — in sauerstoffhaltigem Serum — den Stoffwechsel der Gewebe, aus denen Carcinome entstehen, das Epithel der Haut, der Schleimhaut und der Drüsen, so findet man, daß sie wie der ganze Korper atmen Untersucht man unter den gleichen Bedingungen Carcinomgewebe, so findet man neben der Atmung eine Gärung, und zwar Milchsauregärung

Das erste Versuchsobjekt war das FLEXNER-JOBLINGSCHE Rattencarcinom, das zweite das JENSENsche Rattensarkom, das dritte das ROUSsche Huhnersarkom Alle 3 Tumoren garen qualitativ und quan-

titativ gleich, pro Stunde werden rund 10% des Tumorgewichtes an Milchsäure gebildet. Die Gärung hat mit Nekrose nichts zu tun, da nekrotische Tumorzellen nicht gären, und sie hat mit Bakterien nichts zu tun, da die 3 Tumoren, sachgemäß transplantiert, bakterienfrei sind. Wie die Krebszellen von Ratte und Huhn, so verhalten sich die Krebszellen des Menschen. Krebszellen, die nicht gären, haben wir nicht gefunden. Die Gärung ist eine Eigenschaft, die allen Krebszellen gemeinsam ist, unabhängig von Tierart, Ursprungsgewebe und Entstehungsreiz.

Eine Kontroverse entstand wegen der Gärung der menschlichen Krebszellen. Das Gewebe, das der Chirurg als Krebsgewebe exstirpiert, besteht in der Regel nur zu einem kleinen Teil aus Krebszellen, es ist verunreinigt mit Ursprungsgewebe, Bindegewebe und Nekrosen. Gute Stämme transplantierter Tumoren sind fast Reinkulturen von Krebszellen. Deshalb gärt Krebsgewebe aus transplantierten Tumoren im allgemeinen stärker, als das Krebsgewebe der Chirurgen, und deshalb findet jeder leicht die wahre Gärungsgröße der Krebszelle in transplantierten Tumoren, aber schwieriger und nur unter sorgfältiger histologischer Kontrolle in den Spontantumoren. Berücksichtigt man dies, so wird man die Angaben meines früheren Mitarbeiters KARL POSENER, der die Gärung menschlicher Krebszellen zuerst gemessen hat, immer bestätigt finden.

Was hier noch zur Diskussion steht, sind lediglich die feineren quantitativen Verhältnisse, die Frage, in welchen Grenzen die Gärung der verschiedenen Krebszellen gleich ist. Die bisher vorliegenden Versuche reichen zur Entscheidung dieser Frage nicht aus. Meine Meinung ist, daß alle Carcinomzellen nahezu gleichstark gären, während es sein mag, daß die Gärung der Sarkomzellen, je nach ihrer Herkunft, verschiedener ist.

IV.

Die ersten, die sich die Aufgabe stellten, die in vitro gefundene Gärung der Tumoren im lebenden Tier nachzuweisen, waren C. und F. CORI. Sie bestimmten die Milchsäure in den Axillarvenen von Hühnern, deren einer Flügel ein ROUS-Sarkom trug, und fanden auf der Tumorseite in 100 ccm Blut im Mittel 16 mg Milchsäure mehr, als auf der Normalseite. Ein entsprechender Versuch an einem Menschen mit Unterarmsarkom ergab auf der Tumorseite 6 mg Milchsäure mehr.

CORIS Anordnung war noch nicht ganz beweisend, da man an Stauungsmilchsäure aus dem Muskel denken konnte. Auch waren die Ausschläge, verglichen mit dem Milchsäuregehalt der Venen, klein. Ich habe mich deshalb, gemeinsam mit Dr. WIND, nochmals mit der Frage beschäftigt und mich vor allem bemüht, möglichst reines Tumor-

blut, nicht ein Gemisch von Tumorblut und Normalblut, zur Analyse zu erhalten. Als Versuchsmaterial benutzten wir Ratten mit großen Bauchtumoren, punktierten direkt die auf den Tumoren liegenden Venen und verglichen den Milchsäuregehalt dieser Venen und der Aorta. Wir fanden in allen uns zugänglichen Normalvenen ebensoviel oder weniger Milchsäure, als in der Aorta, aber in den Tumorvenen in jedem Fall mehr Milchsäure als in der Aorta, im Mittel 2—3 mal soviel. Diese Ausschläge sind so groß, daß es sicher ist, daß die Tumoren auch im lebenden Tier gären. Trotzdem häuft sich, wie beiläufig bemerkt sei, die Tumormilchsäure im Blut nicht an, da sie von den normalen Körperzellen immer wieder beseitigt wird. Quantitative Versuche zu dieser Frage verdanken wir Dr. BRUNO MENDEL.

Es wäre erwünscht, wenn die Tumorvenenversuche gelegentlich am Menschen wiederholt würden. Die Schwierigkeit ist hier der geeignete Fall, ein nicht nekrotischer und nicht zu kleiner Medullarkrebs mit übersichtlich verlaufenden Venen.

V.

Der Begriff der Gärung ist seit PASTEUR untrennbar mit der Idee der Anaerobiose verbunden. „Die Gärung ist", sagt PASTEUR, „das Leben ohne Sauerstoff", ein Ausspruch, der auch für die Krebszelle wahr ist. Ich möchte das durch zwei Versuche erläutern.

Dr. OKAMOTO brachte Tumorschnitte in körperwarme Ringerlösung, aus der der Sauerstoff durch Stickstoff ausgetrieben war, und transplantierte nach 24stündiger Anaerobiose. Enthielt die Ringerlösung Glucose, so gingen die Tumoren mit normaler Impfausbeute an, enthielt die Ringerlösung keine Glucose, so gingen die Tumoren nicht an. Die Tumorzelle kann also eine Zeitlang ausschließlich auf Kosten der Gärung existieren.

Dr. WIND untersuchte das anaerobe Verhalten von Tumorzellen in CARRELschen Kulturen. Sein Versuchsmaterial waren ROUS-Sarkome, die frisch aus dem Körper entnommen oder monatelang nach ALBERT FISCHER in Deckglaskultur gezüchtet worden waren. Besonderes Gewicht wurde auf möglichst vollständigen Ausschluß des Sauerstoffes gelegt. In die Kulturgefäße wurde das wirksamste Sauerstoffabsorptionsmittel, das wir haben, gelber Phosphor, gebracht. Dann wurde im Stickstoffstrom zugeschmolzen. Gelber Phosphor leuchtet, während er Sauerstoff absorbiert, und zwar sieht man nach STRUTT Phosphor in Sauerstoff leuchten, bis der Sauerstoffgehalt unter $^1/_{100000}$ Vol.-Proz. gesunken ist. In Dr. WINDS Versuchen war das Leuchten des Phosphors kurze Zeit nach dem Zuschmelzen erloschen, ein Beweis, daß die Kulturgefäße weniger als $^1/_{100000}$ Vol.-Proz. Sauerstoff enthielten.

In diesen Gefäßen wuchs das Sarkom 48 Stunden lang normal und konnte dann ohne Zeichen von Schädigung in Deckglaskulturen aerob weiter gezüchtet werden. Das Rous-Sarkom ist also imstande, 48 Stunden lang ausschließlich auf Kosten der Gärung zu wachsen, d. h. die Energie der Gärung für diejenige Tätigkeit auszunutzen, die charakteristisch für die Krebszelle ist.

Bei längerer Dauer der Anaerobiose geht das Sarkom zugrunde. Es verhält sich in dieser Hinsicht wie der erste fakultative Anaerobiont, den die Wissenschaft kannte, die Kulturhefe, die auch sonst unter den niederen Organismen das beste Analogon der Krebszelle ist. Hefe- und Krebszelle gären nicht nur bei Sauerstoffmangel, wie viele andere fakultative Anaerobionten, sondern sie gären immer, sowohl bei Sauerstoffmangel als auch bei Sättigung mit Sauerstoff. Demgegenüber erscheint es zellphysiologisch unwesentlich, daß die Spaltungsprodukte des Zuckers in der Hefezelle zu Alkohol und Kohlensäure stabilisiert werden.

Die Fähigkeit der Krebszelle, zeitweise ohne Sauerstoff zu wachsen, muß für ihre Ausbreitung im Körper von Bedeutung sein, wie es ja allgemein für die Ausbreitung von Zellen in Nährlösungen wesentlich ist, ob sie ohne Sauerstoff wachsen können oder nicht. Impft man obligat aerobe Zellen in ein Bouillonröhrchen, so wachsen Zellen nur an der Oberfläche, impft man fakultativ anaerobe Zellen, so wird das ganze Röhrchen von Zellen durchwachsen. Im ersten Fall ist das Wachstum beschränkt durch die Diffusion des Sauerstoffes, im zweiten Fall ist es unbeschränkter und formloser.

Sicher ist mit der Befähigung zur Anaerobiose die Bedeutung der Gärung für die Tumorzelle nicht erschöpft, sondern es wird hier außerdem noch eine Rolle spielen, daß die Gärung unter aeroben Bedingungen persistiert. Charakteristisch für die Tumorzelle ist nicht die Gärung schlechthin, sondern die Gärung in Sauerstoff. Vielleicht trifft hier ein Gedanke das richtige, den Dr. Bierich ausgesprochen hat. Bierich vermutet, daß die von dem Tumor entwickelte Milchsäure die Zellen der Umgebung durch Säurewirkung schädigt und so den Weg für die Ausbreitung der Tumoren frei macht. Versuche, die diese Vermutung begründen, fehlen. Was gezeigt werden muß, ist nicht, daß man Körperzellen durch Milchsäure töten kann — das ist selbstverständlich —, sondern daß solche Verschiebungen der Acidität, wie sie sich im Körper in der Umgebung der Krebszellen herausbilden, für normale Zellen schädlich sind.

VI.

Wenn wir mit unseren Kenntnissen über den Stoffwechsel der Krebszelle an die Frage nach dem Ursprung des Carcinoms herangehen,

so haben wir den Vorteil, daß eine meßbare und für das Carcinom charakteristische Eigenschaft vorliegt. Statt wie früher nach dem Ursprung einer Erscheinung fragen zu müssen, deren Natur man nicht kannte, haben wir jetzt in dem Stoffwechsel einen Angriffspunkt und können, statt nach dem Ursprung des Krebses, nach dem Ursprung der Gärung fragen.

Dabei bewährt sich ein Prinzip, das man folgendermaßen entwickeln kann: Es steht experimentell fest, daß der Krebs aus normalen Körperzellen entsteht. Der Krebs gärt, die Ursprungsgewebe gären nicht. Wir verwerfen die Idee, daß Teer, Röntgenstrahlen, Arsen, und alle die anderen carcinombildenden Schädigungen Gärung neu erzeugen, nehmen vielmehr an, daß die Fähigkeit zu gären in dem normalen schon vorhanden ist. So entsteht die Aufgabe, die Carcinomgärung in den Ursprungsgeweben des Carcinoms, dem normalen Epithel oder Bindegewebe, qualitativ und quantitativ zu suchen.

Wir überschätzen dabei nicht die Bedeutung des Stoffwechsels, sondern benutzen die Stoffwechselanalyse als Methode etwa so, wie der Chemiker die Spektralanalyse benutzt. So wenig die Emission von Spektrallinien die einzige wichtige Eigenschaft von Atomen ist, so wenig ist natürlich der Stoffwechsel die einzige wichtige Eigenschaft von Zellen.

VII.

Liebig fand, daß der Körper unter seinen normalen Lebensbedingungen keine Milchsäure ausscheidet, sondern umgekehrt eingeführte Milchsäure zum Verschwinden bringt. Liebig und nach ihm besonders Araki fanden ferner, daß dies nur gilt, wenn die Gewebe mit Sauerstoff gesättigt sind. Bei Mangel an Sauerstoff, in der Erstickung, scheidet der Körper große Mengen an Milchsäure aus.

Nimmt man die Ursprungsgewebe des Carcinoms, das Epithel der Haut, der Schleimhaut und der Drüsen, aus dem Körper heraus und untersucht ihren Stoffwechsel in der Erstickung, so findet man immer Milchsäuregärung, jedoch in viel schwächerem Maße als in der Krebszelle. Erstickte Darmschleimhaut bildet pro Stunde etwa 1% ihres Gewichtes an Milchsäure, ein Darmcarcinom, das aus der Schleimhaut entstanden ist, etwa 10%. In ähnlichem Maße übertrifft die Gärung eines Hautcarcinoms die Gärung erstickter Haut. Wir finden also die Gärung qualitativ in den Ursprungsgeweben wieder, nur verdeckt durch die Sauerstoffatmung. Qualitativ ist der Carcinomstoffwechsel der Erstickungsstoffwechsel des normalen.

Dieses Ergebnis befriedigt nicht unser Prinzip, das quantitative Übereinstimmung verlangt. So wenig wir uns denken können, daß Teer,

Röntgenstrahlen, Arsen usw. Gärung, die nicht vorhanden ist, erzeugen, so unwahrscheinlich ist es, daß sie alle die Gärung um 1000% beschleunigen. Beschleunigungen von energieliefernden Reaktionen in diesem Maße kommen bei der Befruchtung tierischer Eier vor, aber Gifte und Schädigungen beschleunigen die energieliefernden Reaktionen von Körperzellen nicht, sondern hemmen sie nur.

Wenn nun die Gärung des Carcinoms zehnmal so groß ist, als die Gärung der Ursprungsgewebe und trotzdem die Gärungsbeschleunigung, als in Widerspruch mit der Erfahrung, abzulehnen ist, so bleibt nur der Ausweg, daß die Zellen der Ursprungsgewebe ungleich gären, einige sehr stark, die Hauptmenge schwach. Für diese Betrachtungsweise spricht das histologische Bild von Haut und Darmschleimhaut, in dem man die Ungleichartigkeit der Zellen sieht und in dem man bekanntlich zwischen wachsenden und nicht wachsenden Zellen unterscheiden kann.

Die experimentelle Prüfung kam auf die Frage hinaus, ob es im Körper Epithel oder Bindegewebe gibt, das — in der Erstickung — ebenso stark gärt, wie Krebsgewebe. Von vornherein richteten wir dabei unsere Aufmerksamkeit auf die wachsenden Zellen und fanden bald, daß junges Epithel stärker gärt als altes Epithel. Die größte Gärung fanden wir dort, wo die wachsenden Zellen in größter Konzentration vorhanden sind, im embryonalen Gewebe. Hühnerembryonen von einigen Milligrammen gärten in der Erstickung etwa ebenso stark, wie die Tumoren. Die Gärung gleichschwerer Rattenembryonen war kleiner, als die Gärung der Tumoren. Doch zeigte sich in einer Arbeit von NEGELEIN, daß die Gärung der Rattenembryonen am Anfang der Entwicklung rapid abfällt, und daß man auf sehr frühen Entwicklungsstadien auch hier fast genau die Gärung der Tumoren findet.

Es ist also beim Absuchen des Körpers nach der Tumorgärung eine bisher unbekannte Eigenschaft wachsender Körperzellen, nämlich ihre Fähigkeit, in der Erstickung zu gären, entdeckt worden und es ist weiterhin eine Zahl, nämlich die Größe der embryonalen Gärung vorausgesagt und gefunden worden. Der Carcinomstoffwechsel ist quantitativ der Erstickungsstoffwechsel normaler wachsender Körperzellen, und wenn wir auf Grund dieser quantitativ-chemischen Übereinstimmung das Carcinom von den wachsenden und stark gärenden Körperzellen ableiten, so haben wir eine Erklärung dafür, daß das Carcinom wächst und daß es gärt.

VIII.

Es bleibt noch die Frage der Erstickung. Der Carcinomstoffwechsel und der Stoffwechsel der wachsenden Zelle stimmen nur in der Erstickung überein, nicht aber in Sauerstoff, wenn die Zellen atmen. Die Atmung der Carcinomzelle ist, im Gegensatz zur Atmung der embryo-

nalen Zelle, unfähig, die Gärung zu verdecken. Sie ist entweder kleiner oder sie ist weniger wirksam, als in der normalen wachsenden Zelle.

Der Versuch entscheidet zugunsten der ersten Möglichkeit. Wie in dem Muskel nach MEYERHOF immer ein Molekül veratmeten Sauerstoffes 2 Moleküle Milchsäure zum Verschwinden bringt, so haben wir auch in der Carcinomzelle das Verhältnis 1 Sauerstoff : 2 Milchsäure. Nicht weil die Atmung der Carcinomzelle zu unwirksam, sondern weil sie zu klein ist, ist sie unfähig, die Gärung zu verdecken, ein durch Hunderte von Messungen gesichertes Ergebnis. Die Carcinomzelle ist eine wachsende Körperzelle, deren Atmung geschädigt ist.

Um also den Carcinomstoffwechsel aus dem normalen zu erzeugen, muß man die Atmung wachsender Zellen elektiv schädigen, d. h. so schädigen, daß die Gärung nicht getroffen wird. Es ist leicht, diese Wirkung in vitro hervorzubringen und damit das, was im Körper unter dem Einfluß der carcinombildenden Reize geschieht, unter einfacheren Bedingungen zu wiederholen. Bringt man beispielsweise einen Embryo einige Zeit in Stickstoff und dann in Sauerstoff zurück, so ist die Atmung geschädigt, die Gärung unverändert. Die Folge ist, daß die Atmung nicht mehr ausreicht, um die Gärung zu verdecken, also Carcinomstoffwechsel. Zu den Giften, mit denen man die Atmung elektiv schädigen kann, gehört nach Versuchen von Dr. DRESEL die arsenige Säure, zu den mechanischen Schädigungen das Zentrifugieren, z. B. von Leukocyten. Allgemein hat sich gezeigt, daß die Atmung empfindlicher ist als die Gärung, so daß die allerverschiedenartigsten Schädigungen wie im Körper bei der Carcinombildung, so auch in vitro den Carcinomstoffwechsel erzeugen.

IX.

So wenig, wie im Körper bei jeder Schädigung Carcinom entsteht, so wenig entstehen in vitro bei jeder Atmungsschädigung aus wachsenden Zellen Carcinomzellen. Wahrscheinlich ist die Regel, daß man die Zelle tötet, wenn man ihre Atmung schädigt.

Immerhin liegen zwei bemerkenswerte Arbeiten vor, in denen Krebszellen in vitro durch Schädigung wachsender Zellen erzeugt wurden. CARREL behandelte Hühnerembryonen mit Arsen und anderen Giften und injizierte sie dann Hühnern. Er fand, daß metastasierende Sarkome entstanden, an denen die Hühner in einigen Wochen zugrunde gingen.

ALBERT FISCHER ließ auf embryonale Milz in Gewebekultur Arsen einwirken und fand, daß Zellen entstanden, die in der Kultur das Verhalten von Tumorzellen zeigten. Wurden diese Kulturen Hühnern injiziert, so entwickelten sich Sarkome.

In beiden Fällen waren es stark gärende Zellen, aus denen die Tumorzellen erzeugt wurden, das Ergebnis beider Versuche liegt ganz in der Richtung der hier entwickelten Auffassung von der Entstehung der Tumoren.

X.

Ich habe versucht, in diesem Referat zu zeigen, wie die Krebsforschung durch Anwendung der zellphysiologischen Methoden ein Gebiet geworden ist, auf dem Physik und Chemie, Maß und Zahl der Dinge herrschen. Schon jetzt kann man nicht mehr sagen, daß die Natur der Krebszelle unbekannt sei. Wir wissen heute von der Krebszelle etwa ebensoviel wie von der Hefezelle und mehr als von irgendwelchen anderen erkrankten Körperzellen.

Die Ursache des Carcinoms sehe ich in der anaeroben Komponente des Stoffwechsels normaler wachsender Körperzellen sowie in dem Umstand, daß diese Komponente gegen Schädigungen widerstandsfähiger ist, als die Atmung. So kommt es, daß alle Schädigungen, denen der Körper unterworfen ist, die anaerobe Komponente aus dem normalen herauszüchten und damit Zellen von den Eigenschaften der Carcinomzellen.

Biochem. Zeitschr 184, 484. 1927

Über die Klassifizierung tierischer Gewebe nach ihrem Stoffwechsel.

Von

Otto Warburg.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut fur Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. April 1927.)

Klassifizieren wir die Gewebe nach ihrer aeroben Glykolyse in vitro, so kommt es vor, daß dasselbe Gewebe je nach den Versuchsbedingungen einen verschiedenen Platz erhält Beispielsweise ist die aerobe Glykolyse junger Rattenembryonen in Ringerlösung groß, in Serum klein. Leberschnitte in Ringerlösung bilden haufig aerob kleine Mengen Milchsaure, wahrend sie in Serum nicht nur keine Milchsäure ausscheiden, sondern Milchsaure aus dem Serum aufnehmen Es gibt ferner Gewebe, die in vitro — in Serum und aerob — Milchsaure produzieren, wahrend sie, wie die Analyse der zufuhrenden und abführenden Blutgefaße lehrt, in vivo keine Milchsaure produzieren Ursache dieses verschiedenen Verhaltens ist die große Empfindlichkeit der Pasteurschen Reaktion[1], die schneller als die Atmung oder die Garung leidet und durch die in vitro herrschenden Bedingungen unterbrochen werden kann

Im folgenden wird eine Klassifizierung der Gewebe vorgeschlagen, die unabhangiger von den (zufälligen) experimentellen Bedingungen ist. Sie schließt sich an die fruhere, auf der aeroben Glykolyse beruhenden Klassifizierung an und wird mit dieser identisch fur den Grenzfall, daß die Pasteursche Reaktion maximal wirkt

I. Der Gärungsüberschuß *U*.

Die Erfahrung hat gelehrt, daß die Wirkung der Atmung auf die Garung in gärenden Zellen einen Grenzwert besitzt. 1 Molekul veratmeten Sauerstoffs kann bis zu 2 Molekulen Milchsäure am Erscheinen

[1] Diese Zeitschr. 172, 432. 1926.

verhindern Nur ganz selten fanden wir in garenden Zellen eine großere Wirksamkeit, und immer nur dann, wenn die Versuchsfehler groß waren.

Wie man nun in der Thermodynamik nicht mit der zufälligen Arbeit rechnet, die eine chemische Reaktion unter irgendwelchen Bedingungen liefert, sondern mit der maximalen Arbeit, die sie bestenfalls liefern kann, so wollen wir bei der Klassifizierung der Gewebe nicht mit der zufalligen Wirksamkeit der PASTEURschen Reaktion, sondern mit ihrer maximalen Wirksamkeit rechnen. Wir führen zu dem Zwecke den Garungsüberschuß U ein und definieren ihn durch die Gleichung

$$U = Q_M^{N_2} - 2\,Q_{O_2}$$

U ist also der Garungsuberschuß, der bei maximaler Wirkung der PASTEURschen Reaktion übrigbleibt. U ist Null, wenn die anaerobe Gärung gerade gleich der doppelten Atmung ist Im ubrigen ist U negativ oder positiv, je nachdem die doppelte Atmung (nach absolutem Betrag) größer oder kleiner ist als die anaerobe Garung Nur im letzten Falle ist die Atmung „zu klein" im Vergleich zur Garung Wirkt unter irgendwelchen Versuchsbedingungen die PASTEURsche Reaktion maximal[1], so ist der berechnete Garungsuberschuß U mit dem gefundenen identisch, d h

$$U = Q_M^{O_2}$$

und die alte und neue Klassifizierung fallen zusammen

II. Tabelle der Gewebe.

In Tabelle 1 habe ich die fruheren Ergebnisse soweit sie Gewebe betreffen, neu zusammengestellt und die Werte fur Milz und Placenta die MURPHY und HAWKINS zuerst gemessen haben, hinzugefugt Von Tumoren sind drei von uns untersuchte transplantierte Stamme aufgenommen (FLEXNER-JOBLING JENSEN, ROUS) sowie zwei Falle von menschlichen Krebsen, die in bezug auf Krebszellen fast hundertprozentig waren

Wie man sieht, liegen die U-Werte fur die normalen Organe, mit Ausnahme der Retina, zwischen —39 und 0, wahrend die Carcinome und Sarkome große positive U-Werte neben einer anaeroben Garung von rund 30 geben.

---

[1] In Serum ist dies häufiger der Fall als in Ringerlosung. Deshalb — und auch aus anderen Grunden — sollte der Stoffwechsel immer nur in Serum gemessen werden.

Tabelle 1.

Gewebe	Literaturstelle	Q_{O_2}	$Q_M^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_M^{N_2}}$
Niere (Ratte)	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	— 21	+ 3	— 39	—
Schilddrüse (Ratte)	Ebendaselbst	— 13	+ 2	— 24	—
Leber (Ratte)	Ebendaselbst	— 12	+ 3	— 21	—
Darmschleimhaut (Ratte)	Ebendaselbst	— 12	+ 4	— 20	—
Milz (Ratte)	Journ. Gener. Physiol. 8, 115, 1925	— 12	+ 8	— 16	—
Hoden (Ratte)	Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924	— 12	+ 8	— 16	—
Pankreas (Kaninchen)	Ebendaselbst	— 5	+ 3	— 7	—
Pankreas (Hund)	Ebendaselbst	— 3	+ 4	— 2	—
Submaxillaris (Kaninchen)	Ebendaselbst	— 4	+ 3	— 5	—
Thymus (Ratte, 3 Wochen)	Ebendaselbst	— 6	+ 8	— 4	—
Hirnrinde (Ratte)	Ebendaselbst	— 11	+ 19	— 3	—
Embryo (Ratte, 3 mg)	Ebendaselbst **165**, 122, 1925	— 12	+ 13	— 11	—
„ (Ratte, 0,9 mg)	Ebendaselbst	— 13	+ 23	— 3	—
„ (Huhn, 1,7 mg)	Ebendaselbst **152**, 309. 1924	— 10	+ 20	0	—
Hyperplastische Rachenmandeln (Mensch)	Ebendaselbst	— 9	+ 18	0	—
Placenta (Ratte)	Journ. Gener. Physiol. **8**, 115, 1925	— 7,3	+ 14,9	+ 0,3	—
Blasenpapillome (Mensch)	Diese Zeitschr. **152**, 309. 1924	— 13	+ 26	0	—
Nasenpolypen (Mensch)	Ebendaselbst	— 5	+ 14	+ 4	27 %
Blasencarcinom (Mensch)	Klin. Wochenschr. **5**, Nr. 27. 1926	— 10	+ 36	+ 16	45 %
FLEXNER-JOBL. Rattencarcinom	Diese Zeitschr. **152**, 309. 1924	— 7	+ 31	+ 17	55 %
JENSENS Rattensarkom	Ebendaselbst **160**, 52. 1925	— 9	+ 34	+ 16	47 %
ROUS' Hühnersarkom	Ebendaselbst **160**, 307. 1925	— 5	+ 30	+ 20	67 %
Rundzellen-Sarkom (Mensch)	Ebendaselbst **152**, 309. 1924	— 5	+ 28	+ 18	64 %
Retina (Ratte)	Ebendaselbst	— 31	+ 88	+ 26	30 %

Ich bemerke noch, daß sich sämtliche Zahlen der Tabelle auf frisch aus dem Korper entnommene Gewebe beziehen, nicht auf in vitro gezüchtete Gewebe.

III. Carcinome und Sarkome des Menschen.

Da die meisten menschlichen Krebse histologisch unrein sind, so gehoren sie nicht in Tabelle 1. Die auf das Gesamtgewicht bezogenen Werte von Q_{O_2}, $Q_{M}^{N_2}$ und U geben hier keine Auskunft über den Stoffwechsel der Krebszellen. Immerhin zeigt sich, daß auch diese unreinen Gewebe positive U-Werte liefern, und ferner, daß der prozentische Garungsuberschuß $U/Q_{M}^{N_2}$ etwa ebenso groß ist, wie bei den Tumoren, die in bezug auf Krebszellen hundertprozentig sind

Die Mittelwerte für 12 menschliche Carcinome (in Ringerlosung) waren[1]:

$$Q_{O_2} = -5, \qquad Q_{M}^{N_2} = +21,$$

also

$$U = -11, \qquad \frac{U}{Q_{M}^{N_2}} = 52\,\%.$$

Dr H. A. Krebs und F. Kubowitz haben in der letzten Zeit einige menschliche Carcinome in Carcinomserum gemessen und die in Tabelle II verzeichneten Werte gefunden

Tabelle 2

Gewebe	Q_{O_2}	$Q_{M}^{N_2}$	U	$\frac{U}{Q_{M}^{N_2}}$
Mamma-Carcinom (Scirrhus), 20 bis 40 % Krebszellen	−2.6	−11.1	−5.9	53 %
Lebermetastase eines Gallenblasen-Ca 10 bis 20 % Krebszellen	−1.1	−13.6	−11.4	84 %
Haut-Carcinom, 50 bis 70 % Zellen .	−3.1	−13,8	−7.7	56 %
Lippen-Carcinom, 50 bis 70 % Zellen	−3.4	−16.3	−9.5	58 %
			Mittel	26 %

U ist also auch fur Krebszellen in Krebsserum positiv und prozentisch etwa ebenso groß wie in Ringerlosung

Ware ein Spontantumor mit Ursprungsgewebe statt mit Bindegewebe verunreinigt, etwa ein Darmcarcinom mit Darmepithel, so konnte der große negative U-Wert des normalen Epithels den positiven U-Wert der Carcinomzellen verdecken Dann wurde U negativ Doch haben wir bisher solche Falle nicht gefunden

---

[1] Diese Zeitschr. 152, 309 1924.

IV. Blutzellen.

Sowohl weiße Blutzellen[1] als auch die roten Blutzellen der Saugetiere liefern positive *U*-Werte. Fur die roten Blutzellen wird der prozentische Garungsuberschuß sogar extrem groß, weil ihre Atmung verschwindend klein ist Man mag die Blutzellen mit der Retina zu den Ausnahmen rechnen oder sie als frei lebende und im Kreislauf zugrunde gehende Zellen von den Geweben trennen.

V. Spontantumoren bei Inzuchtmäusen.

Murphy und Hawkins[2] haben im Rockefeller-Institut 36 Spontantumoren von Inzuchtmausen untersucht Aus ihrer Tabelle entnehme ich daß 13 Falle positive *U*-Werte liefern, die ubrigen Null- oder negative *U*-Werte. Ein Teil dieser Tumoren verhalt sich also wie die bösartigen Tumoren des Menschen, ein Teil wie gutartige menschliche Tumoren oder wie sehr junges embryonales Gewebe, der Rest wie alteres embryonales Gewebe (etwa wie ein älterer Rattenembryo) Eine nähere Prufung der letzterwahnten Falle wäre erwünscht und insbesondere eine Angabe uber den Grad der Verunreinigung mit Ursprunsgewebe (voraussichtlich Mammagewebe) Ehe man unter den Inzuchttumoren der Mäuse eine neuartige Klasse von Tumoren annimmt, wird man vor allem daran denken (vgl. III), daß Verunreinigungen mit Ursprungsgewebe die Stoffwechseleigenschaften der Tumorzellen verdecken konnen.

VI. Andere Klassifizierung.

Wenn auch die Klassifizierung der Gewebe nach den *U*-Werten ein Fortschritt ist, so mochte ich doch glauben, daß sie spater durch eine Klassifizierung nach der Fahigkeit, anaerob zu leben und zu wachsen, abgelost werden wird Leider fehlen zurzeit noch die Methoden, um Lebens- und Wachstumsfahigkeit der Gewebe unter den Bedingungen der Anaerobiose messend zu vergleichen

---

[1] Fleischmann, W. u F. Kubowitz, diese Zeitschr 181, 395 1927.
[2] Journ. Gen Physiol 8, 115 1925

Biochem Zeitschr. 189, 242. 1927

Stoffwechsel wachsender Zellen (Fibroblasten, Herz, Chorion).

Von

Otto Warburg und Fritz Kubowitz.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 9. September 1927.)

Mit 1 Abbildung.

Alle Erfahrungen[1] über den Stoffwechsel der Korperzellen kann man folgendermaßen zusammenfassen·

Normales Wachstum außer Netzhaut		Carcinome und Sarkome (Mensch, Huhn, Ratte)		Netzhaut	
$Q_M^{N_2} \gtreqless 50$	(1)	$Q_M^{N_2} \gtreqless 50 - 20$	(1a)	$Q_M^{N_2} \gtreqless 200$	1b
$\frac{dQ_M^{N_2}}{dt} < 0$	(2)	$\frac{dQ_M^{N_2}}{dt} = 0$	(2a)	$\frac{dQ_M^{N_2}}{dt} \quad 0$	2b
$U \gtreqless 0$	(3)	$U > 0$	3a	$U \quad 0$	(3b

Hier ist $Q_M^{N_2}$ die anaerobe Glykolyse t die Entwicklungszeit und U der Überschuß der anaeroben Glykolyse uber die doppelte Atmung ($U = Q_M^{N_2} - (2\,Q_{O_2})$).

Gehen die Korperzellen zugrunde, so werden samtliche Beziehungen ungultig im Endzustand ist

$$Q_M^{N} = 0. \quad Q_{O_2} = 0.$$

Doch muß man bedenken, daß der Endzustand nicht plotzlich sondern allmahlich erreicht wird Sinkt dabei die Atmung schneller als die Garung, so kann U fur normale Zellen positiv werden wie in den roten und weißen Zellen des Blutes. Sinkt andererseits die Garung schneller als die Atmung, so kann U fur Carcinomzellen negativ werden

In dieser Mitteilung werden die Beziehungen (1) bis (3) durch neue Beispiele belegt

---

[1] Vgl. O Warburg, diese Zeitschr. 184, 484. 1927. — Krebs, H. A.: ebendaselbst 189, 56. 1927 — Tamiya, C ebendaselbst 189, 114, 175. 1927

1. Fibroblasten[1].

Die Fibroblasten wurden nach CARREL in Plasma-Embryonalsaft auf Deckglasern gezüchtet, ihr Stoffwechsel in Hühnerserum gemessen. Zur Kontrolle wurden Fibroblastenkulturen gemessen, die von Dr. ALBERT FISCHER aus dem ersten CARRELschen Stamme gezüchtet waren. Dieser Stamm lebt seit 16 Jahren in Deckglaskultur und ist etwa 3000mal überpflanzt worden

Das Trockengewicht eines Gewebestucks war von der Großenordnung 10^{-2} mg. 50 bis 70 Gewebestucke waren fur einen Stoffwechselversuch notwendig. Von 100 bis 150 Kulturen wurden 48 Stunden nach der Überpflanzung die besten ausgewahlt, mit einem Messer aus dem Nahrboden herausgeschnitten und mit warmem Huhnerserum längere Zeit gespült, um das anhaftende Plasma zu entfernen. Dann wurden die Gewebestücke in einen Meßtrog gebracht, der frisches, durch spontane Gerinnung erhaltenes Huhnerserum enthielt. Die Messung geschah manometrisch, zuerst in Sauerstoff, dann in Stickstoff, der über Kupfer geglüht war. Wegen der Ungleichartigkeit des Materials war hier das Einzelgefäß mit variiertem v_F dem Gefaßpaar vorzuziehen.

Wurde in CARRELschen Schalen statt auf Deckgläsern gezüchtet, so waren die Resultate schlechter und unregelmaßiger, wahrscheinlich, weil die über dem Gewebe liegende Plasmaschicht bei der Schalenkultur dicker und inkonstanter war als bei der Deckglaskultur. Zuchtungsmethoden, die fur histologische Zwecke genugen, sind fur Stoffwechselversuche, bei denen Gleichartigkeit des Materials verlangt wird, nicht immer brauchbar

Tabelle 1 enthalt das Ergebnis der Messungen, Protokoll 1 zwei vollstandige Versuche Der Stoffwechsel ist am großten in frisch angelegten Kulturen, sinkt bis zur dritten oder vierten Überpflanzung und bleibt dann konstant Nach 6- und 3000maliger Überpflanzung war der Stoffwechsel ungefahr gleich.

48 Stunden nach der ersten Überpflanzung enthalt die Kultur noch betrachtliche Mengen Ursprungsgewebe, das ist Herz neuntagiger Huhnerembryonen. Nach Abb 1 liegt $Q_M^{N_2}$ fur Herzen neuntagiger Embryonen unter 15, wahrend fur Fibroblastenkulturen 48 Stunden nach der ersten Überpflanzung $Q_M^{N_2}$-Werte von 40 bis 50 gefunden wurden Der große Stoffwechsel der jungen Kulturen ist also nicht der Stoffwechsel des Ursprungsgewebes

---

[1] Über den Stoffwechsel von Gewebekulturen vgl auch F. WIND, diese Zeitschrift 179, 384, 1926.

Vergleichen wir die beiden letzten Spalten der Tabelle mit den Stoffwechselbedingungen (1) und (3), so zeigt sich, daß sie erfüllt sind. Denn es ist für Fibroblasten:

$$Q_M^{N_2} \gtreqless 48, \qquad U = -3{,}5.$$

Tabelle 1.

Fibroblasten aus Deckglaskultur, in Hühnerserum gemessen. Das Serum enthielt etwa 0,25% Glucose und war in bezug auf Bicarbonat $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ bis $3{,}0 \cdot 10^{-2}$ normal

Alter der Kultur, die immer 48 Std. nach der Überpflanzung gemessen wurde. Zahl der Überpflanzungen	Mittleres Gewicht eines Gewebestückes mg	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	$U = Q_M^{N_2} - 2\,Q_{O_2}$
1	0,019	—22,6	—7,6	—48,5	—3,3
1	0,015	—22,9	+9	—42	—3,6
1	0,017	—22	—6,6	—38	—5,5
3	0,013	—16,2	—3	—35,4	—3,1
3	0,013	—12	—5,3	—23,6	0
4	0,015	—15	—4,8	—23	—7,3
5	0,019	—10	—4,8	—12,6	—7,2
6	0,017	—11	—7	—17,5	—5,1
8	0,008	—12,5	—4,3	—19,3	—5,7
etwa 3000	0,024	—12	—6	—17	—7,2
				Mittel:	—3,5

Als Versuchsobjekte für Stoffwechselmessungen sind Fibroblastenkulturen ungeeigneter als körperfrische, wachsende Gewebe. Obwohl histologisch einheitlicher, sind sie physiologisch ungleichartiger und haben in älteren Kulturen einen Stoffwechsel, der wahrscheinlich niedriger ist, als er im Körper wäre

Könnte man den Stoffwechsel der Fibroblasten während ihres Wachstums in dem Kulturmedium messen, so würde man voraussichtlich nichts anderes finden als nach Übertragung der Kulturen in Hühnerserum Der Stoffwechsel eines sich furchenden Seeigeleis ändert sich nicht, wenn man die Furchung durch Narkotica verhindert[1] Für die Fibroblasten ist ein entsprechender Versuch aus methodischen Gründen nicht ausführbar Schon Wind[2] hat darauf hingewiesen, daß die Konzentrationen der Stoffe an den Oberflächen der festliegenden Gewebestücke undefiniert und inkonstant sind, z B. die Konzentration des Sauerstoffs, der Kohlensäure, der Milchsäure, der Glucose Wird unter solchen Umständen ein Stoff m im Stoffwechsel verbraucht oder gebildet, so ändert sich der Stoffwechsel dm/dt mit der Zeit. Man kann zwar das Integral $\int \frac{dm}{dt}\,dt$ messen, aber daraus den Stoffwechsel dm/dt nicht berechnen.

[1] Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumoren, S. 31 Julius Springer 1926; Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol Chem. **66**, 305. 1910

[2] Wind, F.: Stoffwechsel von Gewebeexplantaten, diese Zeitschr. **179**, 384. 1926.

2. Epithel.

Für Epithel, das Dr. ALBERT FISCHER aus embryonalem Hühnergehirn gezüchtet hatte, fanden wir in Hühnerserum (vgl. Protokoll 2)

$$Q_{O_2} = -24{,}6, \quad Q_M^{O_2} = -12{,}5, \quad Q_M^{N_2} = +34, \quad U = -15,$$

also auch hier Übereinstimmung mit den Beziehungen (1) und (3).

3. Embryonale Herzen.

Wir untersuchten embryonale Hühnerherzen in verschiedenen Stadien der Entwicklung und fanden in Hühnerserum (vgl. Protokoll 3)

Brütungszeit	Trockengewicht eines Herzens mg	Q_{O_2}	$Q_M^{O_2}$	$Q_M^{N_2}$	U
4 Tage	0,07	−30	−12,5	−52	−8,1
6 „	0,30	−14,6	0	−25	−4,2
7 „	0,80	−15,1	+3,3	−15	−16

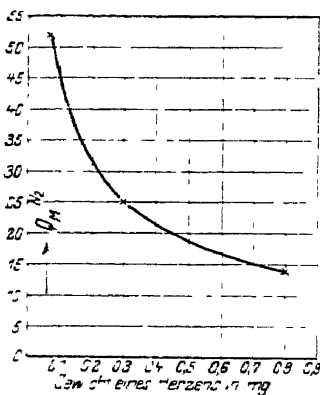



Abb. 1.

In Abb. 1 ist $Q_M^{N_2}$ als Funktion des Herzgewichts aufgetragen, und man sieht, wie $Q_M^{N_2}$ im Laufe der Entwicklung kleiner wird. Es ist

$$Q_M^{N_2} \gtreqless 52,$$

$$\frac{d\,Q_M^{N_2}}{dt} < 0.$$

Die Berechnung von U ist hier nicht einwandfrei, weil die Herzen in Sauerstoff schlagen und in Stickstoff nicht schlagen. Berechnen wir U trotzdem, so ist $U < 0$.

Da Herzen histologisch einfacher zusammengesetzt sind als Embryonen, und $Q_M^{N_2}$ größer ist als für Embryonen gleichen Alters, so sind Herzen als Versuchsmaterial ganzen Embryonen vorzuziehen.

4. Chorion.

Noch günstiger als Herz ist Chorion, dessen Glykolyse E. NEGELEIN[1] zuerst gemessen hat. Hier fällt die Komplikation der äußeren Arbeitsleistung fort. Chorion ist histologisch einfach gebaut, sehr dünn und kann leicht in physiologisch gleichartigem Zustande beschafft werden.

---

[1] NEGELEIN, E.: diese Zeitschr. **165**, 122. 1925.

In der Arbeit von NEGELEIN fehlt ein vollständiger Stoffwechselversuch für Chorion in Serum. NEGELEIN hat diesen Versuch nachgeholt und folgende Werte gefunden (Protokoll 4):

$$Q_{O_2} = -18, \quad Q_M^{O_2} = 0, \quad Q_M^{N_2} = -33, \quad U = -3.$$

Es ist also

$$Q_M^{N_2} = 33,$$
$$U < 0$$

in Übereinstimmung mit (1) und (3). Daß für Chorion auch $\frac{d Q_M^{N_2}}{dt} < 0$ gilt, hat NEGELEIN in der zitierten Arbeit schon nachgewiesen.

5. Protokolle.

Protokoll 1.

Fibroblasten in frischem Hühnerserum 37,8°.

I Nach einer Umpflanzung, 55 Gewebestücke = 0,84 mg trocken	II Nach etwa 3000 Überpflanzungen 50 Gewebestücke = 1,22 mg trocken
$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0,075$ $\quad B_0 = 477$ $v_F = 7,0$ $\quad v_G = 6,92$ $K_{O_2} = 0,626$ $\quad K^R_{CO_2} = 0,987$ $\quad K^S_{CO_2} = 1,512$ 5% CO_2 in O_2	$\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0,079$ $\quad B_0 = 612$ $v_F = 1,5$ $\quad v_G = 2,07$ $K_{O_2} = 0,191$ $\quad K^R_{CO_2} = 0,265$ $\quad K^S_{CO_2} = 0,386$ 5% CO_2 in O_2
Nach 15′ . . . — 3,5 mm " 15′ . . . — 3,0 "	Nach 15′ . . . — 3,5 mm " 15′ . . . — 6,0 " " 15′ . . . — 5,0 " " 15′ . . . — 5,0 "
$v_F = 3,0$ $\quad v_G = 10,92$ $k_{O_2} = 0,097$ $\quad k^R_{CO_2} = 1,12$ $\quad k^S_{CO_2} = 1,[illegible]$ 5% CO_2 in O_2	$v_F = 0,5$ $\quad v_G = 3,07$ $k_{O_2} = 0,271$ $\quad k^R_{CO_2} = 0,297$ $\quad k^S_{CO_2} = 0,[illegible]$ 5% CO_2 in O_2
Nach 15′ . . . 0 mm " 15′ . . . 0	Nach 15′ . . . — 3,0 mm " 15′ . . . 2,5 "
$v_F = 3,0$ $\quad v_G = 10,92$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,11[illegible]$ $k^S_M = 1,470$ 5% CO_2 in N_2	$v_F = 0,5$ $\quad v_G = 3,07$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0,128$ $k^S_M = 0,361$ 5% CO_2 in N_2
Nach 15′ . . . — 6 mm " 15′ . . . + 6 " " 15′ . . . — 6 "	Nach 10′ . . . 9 mm " 10′ . . . 11 " " 10′ . . . 9 "
$Q_{O_2} = -22,9$ $\quad Q_M^{O_2} = -9$ $Q_M^{N_2} = -42$	$Q_{O_2} = -12,2$ $\quad Q_M^{O_2} = +5,9$ $Q_M^{N_2} = -17,2$

Protokoll 2. Epithel aus embryonalem Hühnergehirn in frischem Hühnerserum. 37,6°.	*Protokoll 3.* Embryonale Hühnerherzen in frischem Hühnerserum. 37,8°.
Gewicht der Gewebestücke 0,55 mg trocken $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0{,}078$ $B_0 = 590$ $v_F = 1{,}5$ $v_G = 2{,}07$ $K_{O_2} = 0{,}186$ $K^R_{CO_2} = 0{,}263$ $K^S_{CO_2} = 0{,}380$ 5% CO_2 in O_2	27 Herzen = 1,83 mg trocken. $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_C = 0{,}083$ $B_0 = 511$ $v_F = 7{,}0$ $v_G = 6{,}56$ $K_{O_2} = 0{,}594$ $K^R_{CO_2} = 0{,}955$ $K^S_{CO_2} = 1{,}538$ 5% CO_2 in O_2
Nach 15' . . . . . . − 4,5 mm „ 15' . . . . . . − 5,0 „ „ 15' . . . − 4,5 „ ↓ $v_F = 0{,}5$ $v_G = 3{,}07$ $k_{O_2} = 0{,}271$ $k^R_{CO_2} = 0{,}297$ $k^S_{CO_2} = 0{,}336$ 5% CO_2 in O_2	Nach 10' . . . . . − 6,5 mm „ 10' . . . . − 7,5 „ „ 10' . . . . . . − 7,0 „ ↓ $v_F = 3{,}0$ $v_G = 10{,}56$ $k_{O_2} = 0{,}936$ $k^R_{CO_2} = 1{,}091$ $k^S_{CO_2} = 1{,}341$ 5% CO_2 in O_2
Nach 15' . . . . . . + 3,0 mm „ 15' . . . . + 2,5 „ ↓ $v_F = 0{,}5$ $v_G = 3{,}07$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0{,}132$ $k^S_M = 0{,}363$ 5% CO_2 in N_2	Nach 15' . . . − 0,5 mm „ 15' . . . . . . − 0 „ ↓ $v_F = 3{,}0$ $v_G = 10{,}56$ $\left(\frac{\Delta u}{\Delta p}\right)_M = 0{,}116$ $k^S_M = 1{,}439$ 5% CO_2 in N_2
Nach 30' . . . + 24 mm „ 30' . + 28 „	Nach 10' . + 11 mm „ 10' . + 10,5 „ „ 10' . . . + 11,5 „
$Q_{O_2} = -24{,}6$ $Q^{O_2}_M = +12{,}5$ $Q^{N_2}_M = +34$ $U = -15$	$Q_{O_2} = -30$ $Q^{O_2}_M = -12{,}5$ $Q^{N_2}_M = +51{,}9$

Protokoll 4.

Chorion der Ratte in Rattenserum bei 37,5°.

	Frisches Serum. 4 Häute = 8,23 mg	Serum 30′ bei 56° inaktiviert 3 Häute = 6,43 mg.
	$v_F = 7{,}0$ $v_G = 6{,}16$ $K_{O_2} = 0{,}56$ $K_{CO_2} = 0{,}92$ $K^S_{CO_2} = 1{,}66$ 5% CO_2 in O_2	$v_F = 7{,}0$ $v_G = 6{,}10$ $K_{O_2} = 0{,}55$ $K_{CO_2} = 0{,}91$ $K^S_{CO_2} = 1{,}62$ 5% CO_2 in O_2
Nach 10′ „ 10′	– 30,0 mm – 29,5 mm	– 26,5 mm – 26,0 „
	$v_F = 3{,}0$ $v_G = 10{,}16$ $k_{O_2} = 0{,}90$ $k_{CO_2} = 1{,}05$ $k^S_{CO_2} = 1{,}37$ 5% CO_2 in O_2	$v_F = 3{,}0$ $v_G = 10{,}10$ $k_{O_2} = 0{,}89$ $k_{CO_2} = 1{,}05$ $k^S_{CO_2} = 1{,}35$ 5% CO_2 in O_2
Nach 10′ „ 10′	– 10,0 mm – 10,0 „	– 9,0 mm – 9,0 „
	$k^S_M = 1{,}57$ 5% CO_2 in N_2	$k^S_M = 1{,}55$ 5% CO_2 in N_2
Nach 10′ „ 10′	+ 29 mm + 28 „	– 24 mm – 23 „
	$Q_{O_2} = -18$ $Q_M^{O_2} = 0$ $Q_M^{N_2} = +33$ $U = -3$	$Q_{O_2} = -19{,}8$ $Q_M^{O_2} = 0$ $Q_M^{N_2} = -34$ $U = -5{,}6$

IV. Bibliographie.

WARBURG, O.: Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem 57, 1. 1908.

— Zur Biologie der roten Blutzellen. Ebenda 59, 112 1909.

— Über die Oxydationen im Ei. Ebenda 60, 443. 1909.

— Maßanalytische Bestimmung kleiner Kohlensäuremengen. Ebenda 61, 261. 1909.

— Über die Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigelei. Ebenda 66, 305. 1910.

— Über Beeinflussung der Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen an roten Blutkörperchen. Ebenda 69, 452. 1910.

— Über Beeinflussung der Sauerstoffatmung. Ebenda 70, 413 1911.

ONAKA, M.: Über die Wirkung des Arsens auf die roten Blutzellen. Ebenda 70, 433 1910.

— Über Oxydationen im Blut Ebenda 71, 193. 1911

WARBURG, O. Über Beeinflussung der Sauerstoffatmung. Ebenda 71, 479. 1911

WARBURG, O und R. WIESEL. Über die Wirkung von Substanzen homologer Reihen auf Lebensvorgänge. Pflugers Archiv f d ges Physiol 144, 465. 1912

— Über die Hemmung der Blausäurewirkung in lebenden Zellen. Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol Chem 76, 331 1912.

GRAFE, E : Über die Wirkung von Ammoniak und Ammoniakderivaten auf die Oxydationsprozesse in Zellen Ebenda 79, 421 1912

DORNER, A : Über Beeinflussung der alkoholischen Gärung in der Zelle und im Zellpreßsaft. Ebenda 81, 99 1912

USUI, R.: Über die Bindung von Thymol in roten Blutzellen Ebenda 81, 175 1912

WARBURG, O Über Beziehungen zwischen Zellstruktur und biochemischen Reaktionen Pflugers Arch. f d. ges. Physiol. 145, 277 1912

USUI, R : Über Messung von Gewebsoxydationen in vitro Ebenda 147, 100 1912

WARBURG, O u O MEYERHOF. Über Atmung in abgetöteten Zellen und in Zellfragmenten. Ebenda 148, 295 1912

DORNER, A Über Titration kleiner Kohlensäuremengen Hoppe-Seylers Zeitschr f physiol Chem 88, 425 1913

WARBURG, O Über die Wirkung der Zellstruktur auf chemische Vorgänge in Zellen Jena 1913, Gustav Fischer

— Beiträge zur Physiologie der Zelle, insbesondere die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen. Ergebn d Physiol 14, 253 1914

— Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und über Sauerstoffatmung in Berkefeld-Filtraten wässeriger Leberextrakte Pflugers Arch f d ges. Physiol 154, 599. 1913.

— Über die Verbrennung der Oxalsäure an Blutkohle und die Hemmung dieser Reaktion durch indifferente Narkotica. Ebenda 155, 547. 1914

— Zellstruktur und Oxydationsgeschwindigkeit nach Versuchen am Seeigelei Ebenda 158, 189. 1914.

— Über die Empfindlichkeit der Sauerstoffatmung gegenuber indifferenten Narkotica. Ebenda 158, 19 1914.

WARBURG, O Über die Rolle des Eisens in der Atmung des Seeigeleis nebst Bemerkungen uber einige durch Eisen beschleunigte Oxydationen. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol Chem **92**, 231. 1914
— Notizen zur Entwicklungsphysiologie des Seeigeleis. Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. **160**, 324 1915.
DORNER, A. Über Verteilungsgleichgewichte einiger indifferenter Narkotica. Sitzungsber d Heidelberg Akad B 1914. 1 Abhandlung
WARBURG, O.: Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensaurezersetzung in lebenden Zellen Biochem. Zeitschr. **100**, 230. 1919.
— Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensaurezersetzung in lebenden Zellen. Ebenda **103**, 188 1920.
— u. E. NEGELEIN. Über die Reduktion der Salpetersäure in grunen Zellen. Ebenda **110**, 66. 1920
— — Über die Oxydation des Cystins und anderer Aminosäuren an Blutkohle. Ebenda **113**, 257. 1921.
— Physikalische Chemie der Zellatmung. Ebenda **119**, 134 1921.
— u. E. NEGELEIN: Über den Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation. Zeitschr f. physikal. Chem **102**, 235. 1922.
— Über die antikatalytische Wirkung der Blausaure. Biochem Zeitschr. **136**, 266. 1923.
— u. SEIGO MINAMI Versuche an uberlebendem Carcinomgewebe. Klin Wochenschrift **2**, 17. 1923
— u. S. SAKUMA. Über die sogenannte Autoxydation des Cysteins. Pflugers Arch. f. d ges. Physiol. **200**, 203. 1923.
— u. E. NEGELEIN. Über den Einfluß der Wellenlange auf den Energieumsatz bei der Kohlensäureassimilation Zeitschr. f. physikal Chem **106**, 191. 1923.
SAKUMA, S.: Über die sogenannte Autoxydation des Cysteins. Biochem. Zeitschr. **142**, 68. 1923
WARBURG, O. Versuche an uberlebendem Carcinomgewebe Ebenda **142**, 317. 1923.
MINAMI, S.. Versuche an uberlebendem Carcinomgewebe Ebenda **142**, 334. 1923.
NEGELEIN, E Über die Reaktionsfähigkeit verschiedener Aminosauren an Blutkohle sowie gegenuber Wasserstoffsuperoxyd Ebenda **142**, 493 1923
WARBURG, O: Über die Grundlagen der Wielandschen Atmungstheorie Ebenda **142**, 518. 1923
— u. W. BREFELD Über die Aktivierung stickstoffhaltiger Kohlen durch Eisen. Ebenda **145**, 461 1924.
— u. M. YABUSOE Über die Oxydation von Fructose in Phosphatlosungen. Ebenda **146**, 380. 1924
— u. T. UYESUGI Über die Blackmansche Reaktion. Ebenda **146**, 486 1924
— Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glykolyse Ebenda **152**, 51. 1924.
—, KARL POSENER u E. NEGELEIN. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. Ebenda **152**, 309. 1924.
— Bemerkung uber das Kohlemodell. Ebenda **152**, 191. 1924.
— Über Eisen, den sauerstoffübertragenden Bestandteil des Atmungsferments. Ebenda **152**, 479. 1924
YABUSOE, M.: Über den Temperaturkoeffizienten der Kohlensaureassimilation. Ebenda **152**, 498. 1924.
— Über Eisen und Blutfarbstoffbestimmungen in normalen Geweben und in Tumorgewebe. Ebenda **157**, 388. 1925.

YABUSOE, M.: Über Hemmung der Tumorglykolyse durch Anilinfarbstoffe. Ebenda **168**. 227. 1925.

TANAKA, K.: Versuche zur Prüfung der Wielandschen Atmungstheorie. Ebenda **157**, 425. 1925.

NEGELEIN, E.: Versuche über Glykolyse. Ebenda **158**, 121. 1925.

WIND, F.: Über die Oxydation von Dioxyaceton und Glycerinaldehyd in Phosphatlösungen und die Beschleunigung der Oxydation durch Schwermetalle. Ebenda **159**, 58. 1925

OKAMOTO, J.: Über Anaerobiose von Tumorgewebe. Ebenda **160**, 52. 1925.

WARBURG, O.: Über Milchsäurebildung beim Wachstum. Ebenda **160**, 307. 1925.

— Manometrische Messung des Zellstoffwechsels im Serum. Ebenda **164**, 481. 1925.

NEGELEIN, E.: Glykolytische Wirkung des embryonalen Gewebes. Ebenda **165**, 122. 1925.

WARBURG, O.: Über die Wirkung der Blausäure auf die alkoholische Gärung. Ebenda **165**, 196. 1925.

NEGELEIN, E.: Über die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf chemische Vorgänge in Zellen. Ebenda **165**, 203. 1925.

WARBURG, O.: Versuche über die Assimilation der Kohlensäure. Ebenda **166**, 386. 1925

—, F. WIND und E. NEGELEIN. Über den Stoffwechsel der Tumoren im Körper. Klin. Wochenschr. **5**, 19. 1926.

STAHL, O. u. O. WARBURG: Über Milchsäuregärung eines menschlichen Blasencarcinoms. Ebenda **5**, 27. 1926.

TODA, S.: Über die Oxydation der Oxalsäure durch Jodsäure in wässeriger Lösung. Ebenda **171**, 231. 1926.

— Über die Wirkung von Blausäureäthylester auf Schwermetallkatalysen. Ebenda **172**, 17. 1926

— Über „Wasserstoffaktivierung" durch Eisen. Ebenda **172**, 34. 1926.

WARBURG, O.: Über die Wirkung von Blausäureäthylester auf die Pasteursche Reaktion. Ebenda **172**, 432. 1926

— Über die Oxydation der Oxalsäure durch Jodsäure. Ebenda **174**, 497. 1926.

— Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe. Ebenda **177**, 471. 1926

WIND, F.: Über den Stoffwechsel von Gewebesexplantaten und deren Wachstum bei Sauerstoff- und Glucosemangel. Ebenda **179**, 384. 1926

DRESEL, K.: Über die Wirkung der arsenigen Säure auf Atmung und Gärung. Ebenda **178**, 70. 1926

GAFFRON, H.: Über eine photochemische Wirkung des Hämatoporphyrins. Naturwissenschaften 1925. Heft 41

— Über Photoxydation mittels fluoreszierender Farbstoffe. Biochem. Zeitschr. **179**, 157. 1926

WARBURG, O.: Über den heutigen Stand des Carcinomproblems. Naturwissenschaften 1927. Heft 1

— Über reversible Hemmung von Gärungsvorgängen durch Stickoxyd. Naturwissenschaften 1927. Heft 2

— Über Kohlenoxydwirkung ohne Hämoglobin und einige Eigenschaften des Atmungsferments. Naturwissenschaften 1927. Heft 26.

KREBS, H. A.: Über die Rolle der Schwermetalle bei der Autoxydation von Zuckerlösungen. Biochem. Zeitschr. **180**, 377. 1927

FLEISCHMANN, W. und F. KUBOWITZ: Über den Stoffwechsel der Leukocyten. Ebenda 181, 395. 1927.

WARBURG, O.: Über die Klassifizierung der Gewebe nach ihrem Stoffwechsel. Ebenda 184, 484. 1927.

GAFFRON, H.: Sauerstoffubertragung durch Chlorophyll und das photochemische Äquivalentgesetz. Berichte der d chem. Gesellschaft 60, 755. 1927.

EMERSON, R.: The effect of certain respiratory inhibitors on the respiration of chlorella. Journ. General Physiology 10, 469. 1927

WARBURG, O.: Über Kupfer im Blutserum des Menschen. Klin. Wochenschr. 6, Nr 23. 1927.

— Methode zur Bestimmung von Kupfer und Eisen und uber den Kupfergehalt des Blutserums. Biochem. Zeitschr. 187, 255. 1927.

— Über die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung Ebenda 189, 354 1927

— u. F. KUBOWITZ: Stoffwechsel wachsender Zellen. Ebenda 189, 242. 1927

— Stoffwechsel der Hefe. Ebenda 189, 350. 1927

— u. H. A. KREBS: Über locker gebundenes Kupfer und Eisen im Blutserum. Ebenda 190, 143 1927.

KREBS, H. A.: Stoffwechsel der Netzhaut. Ebenda 189, 57. 1927

— u. F. KUBOWITZ: Über den Stoffwechsel von Carcinomzellen in Carcinomserum und Normalserum. Ebenda 189, 194. 1927.

TAMIYA, Ch: Über den Stoffwechsel der Netzhaut in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung Ebenda 189, 114 1927

— Über den Stoffwechsel der Leber in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung Ebenda 189, 175. 1927.

GAFFRON, H: Die photochemische Bildung von Peroxyd bei der Sauerstoffubertragung durch Chlorophyll Berichte d deutsch chem Gesellsch 60, 2229. 1927.

ENDRES, G u. F KUBOWITZ, Stoffwechsel der Blutplättchen Biochem Zeitschr 191, Heft 4,6

KEMPNER, W, Atmung im Plasma pestkranker Huhner, Klinische Wochenschr. 1927 Heft 50

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.